

# **UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Inmunología



## **TESIS DOCTORAL**

### **Resistencia a los nuevos antivirales frente al virus de la hepatitis C**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

**Zulema Plaza Almuedo**

Directores

Eva Poveda López  
Vicente Soriano Vázquez

**Madrid, 2014**

**UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID**

**FACULTAD DE MEDICINA**

**Departamento de Inmunología**



**RESISTENCIA A LOS NUEVOS ANTIVIRALES  
FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

**TESIS DOCTORAL**

**Zulema Plaza Almuedo**

**Madrid, 2013**

## **TESIS DOCTORAL**

### **RESISTENCIA A LOS NUEVOS ANTIVIRALES FRENTE AL VIRUS DE LA HEPATITIS C**

Esta memoria ha sido presentada para optar al grado de Doctor en Biología por la Universidad Complutense de Madrid por el licenciado:

**Zulema Plaza Almuedo**

Directores de Tesis:

**Dra. Eva Poveda López**

Doctora en Microbiología Médica

Grupo de Virología Clínica

Instituto de Investigación Biomédica de A Coruña (INIBIC)

Complejo Hospitalario Universitario de A Coruña

**Dr. Vicente Soriano Vázquez**

Doctor en Medicina

Servicio de Enfermedades Infecciosas

Hospital Carlos III, Madrid

**Madrid, 2013**

**Vº Bueno directores de tesis:**



## ÍNDICE

---

<b>RESUMEN</b>	<b>1</b>
<b>INTRODUCCIÓN</b>	<b>9</b>
1.1. Estructura molecular del VHC	11
1.2. Ciclo replicativo del VHC	14
1.3. Variabilidad genética del VHC	17
1.4. Tratamiento de la infección crónica por VHC	19
1.5. Nuevos Agentes Antivirales de Acción Directa (AAD)	20
a) Inhibidores de la proteasa	22
b) Inhibidores de la polimerasa análogos de nucleósido (NI)	27
c) Inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido (NNI)	29
d) Inhibidores de NS5A	32
1.6. Resistencias a los AAD	34
a) Resistencia a inhibidores de la proteasa	35
b) Resistencia a inhibidores de la polimerasa análogos de nucleósido (NI)	37
c) Resistencia a inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido (NNI)	38
d) Resistencia a inhibidores de NS5A	40
1.7. Otros fármacos en desarrollo frente al VHC	41
<b>OBJETIVOS</b>	<b>43</b>
<b>PACIENTES Y MÉTODOS</b>	<b>47</b>
2.1. Población de estudio	49
2.2. Recogida de muestras	49

2.3. Determinación de la carga viral plasmática del VIH	49
2.4. Determinación de la carga viral plasmática del VHC	50
2.5. Determinación del genotipo del VHC	50
2.6. Extracción del ARN viral	50
2.7. Amplificación de la proteasa NS3, NS5A y polimerasa NS5B	50
2.8. Visualización y purificación de los amplicones de PCR	52
2.9. Secuenciación	52
2.10. Análisis de las secuencias	53
2.11. Datos epidemiológicos y marcadores biológicos	54
2.12. Análisis estadístico	54

## **ESTUDIO 1: Impacto de la variabilidad genética en la proteasa NS3, polimerasa NS5B y la proteína NS5A en la respuesta a los nuevos AAD**

**55**

3.1. Objetivo y diseño del estudio	57
3.2. Pacientes y métodos	58
3.2.1. Población de estudio	58
3.2.2. Análisis de las secuencias	58
3.3. Resultados	58
3.3.1. Polimorfismos en la proteasa NS3	59
3.3.2. Polimorfismos en la polimerasa NS5B	60
3.3.3. Polimorfismos naturales en la proteína NS5A	62
3.4. Discusión	64

**Estudio 2: Prevalencia de polimorfismos naturales asociados con resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3 frente al VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC** **71**

4.1. Objetivo y diseño del estudio	73
4.2. Pacientes y métodos	73
4.2.1. Población de estudio	73
4.2.2. Determinación carga viral y genotipo del VHC	73
4.2.3. Amplificación de la región NS3	74
4.2.4. Análisis de las secuencias	75
4.3. Resultados	76
4.3.1. Características basales de los pacientes del estudio	76
4.3.2. Cambios asociados con resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3	77
4.4. Discusión	78

**Estudio 3: Prevalencia de polimorfismos naturales NS5B asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa frente al VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC** **83**

5.1. Objetivo y diseño del estudio	85
5.2. Pacientes y métodos	85
5.2.1. Población de estudio	85
5.2.2. Amplificación de la región NS5B	86
5.2.3. Análisis de las secuencias	87
5.3. Resultados	87
5.3.1. Características basales de los pacientes del estudio	87
5.3.2. Cambios asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B no análogos de nucleósido(NNI)	88
5.3.3. Cambios asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B análogos de nucleósido(NI)	89
5.3.4. Impacto del tratamiento antirretroviral frente al VIH sobre la variabilidad de la polimerasa NS5B del VHC	89
5.4. Discusión	91



<b><u>Estudio 4: Prevalencia de polimorfismos naturales asociados con resistencia a los inhibidores de la proteína NS5A frente al VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC</u></b>	<b>95</b>
6.1. Objetivo y diseño del estudio	97
6.2. Pacientes y métodos	97
6.2.1. Población de estudio	97
6.2.2. Amplificación de la región NS5A del VHC	98
6.2.3. Análisis de las secuencias	101
6.2.4. Comparación barrera genética genotipos 1a vs.1b	101
6.3. Resultados	101
6.3.1. Características basales de los pacientes del estudio	101
6.3.2. Polimorfismos naturales asociados con resistencias a Daclatasvir	102
6.3.3 Comparación de la barrera genética de los pacientes de genotipos 1a vs. 1b	103
6.4. Discusión	105
<b>CONCLUSIONES</b>	<b>111</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA</b>	<b>115</b>
<b>ABREVIATURAS</b>	<b>127</b>
<b>ANEXOS</b>	<b>133</b>
ANEXO I: Publicaciones surgidas de esta tesis	135
ANEXO II: Copia de las publicaciones relacionadas con esta tesis	137

## SUMMARY

---



Recent advanced in the molecular knowledge of the HCV replication life cycle have led to discovering of molecules that specifically block HCV viral proteins called direct acting antivirals agents (DAA). These molecules interact with different HCV proteins, including NS3/4A protease, NS5B polymerase and NS5A.

In any given infected individual, HCV exists as a diverse population of non-identical but closely related viral genomes known as quasispecies. In this cloud of rapidly evolving viral genomes, HCV variants carrying single and/or double drug resistance mutations are created and positively or negatively selected every day. Therefore, before beginning any antiviral therapy, drug resistance HCV variants are already present; and treatment selects these pre-existing viruses. Drug resistance may drive to failure only when escape mutant viruses expand and became predominant in the whole viral population under drug pressure. On the contrary, when a complete suppression of viral replication is achieved, escape and enrichment of the viral population with drug-resistant variants cannot occur. The use of DAA as monotherapy facilitates the rapid selection of resistance and treatment failure. In contrast, the combination of potent DAA blocking different steps of the HCV replication cycle provides the best strategy to avoid selection of drug resistance and ensure treatment success.

Whereas most DAA have demonstrated a potent antiviral activity against HCV, emergence of drug resistance represents a huge challenge with almost all these drugs. The emergence of selection of resistance to DAA results from incomplete suppression of viral replication under DAA pressure. Several factors influence this phenomenon, including the high replication rate of HCV, the low fidelity of the HCV polymerase, the

suboptimal antiviral potency of the drug(s), the barrier to resistance and the degree of patient's adherence to therapy. The barrier to resistance refers to the difficulty for losing drug susceptibility by viruses originally susceptible. Several factors are involved, including a low/high therapeutic ratio, an easy/difficult drug dosing, and the high/low impact of mutations on drug susceptibility. The latest aspect is known as *genetic barrier* to resistance. Drugs with a low genetic barrier are those whose activity is blunted upon selection of a single drug resistance mutation. On the contrary, drugs with a high genetic barrier to resistance are those that require accumulation of several resistance changes to see a significant compromise in their activity.

Several compounds belonging to distinct drug families (NS3 protease, NS5B polymerase nucleos(t)ide analogues, NS5B non-nucleos(t)ide analogues and NS5A inhibitors) are currently in advance stages of clinical development. Although each family displays different characteristics, almost all of them exhibit a low barrier to resistance. The exception are the nucleos(t)ide analogues (NI) that inhibit the HCV NS5B polymerase. Resistance changes for these compounds have been described at codon 282 (i.e., S282T), at the catalytic site of the enzyme. In fact, this mutation has only been described in one patient who fails treatment with sofosbuvir (NI). This is most likely due to the enormous impact on viral fitness resulting from this change that practically annuls the enzymatic activity of the HCV polymerase, halting viral replication. Drug resistance mutations and pathways differ according to antiviral agents and HCV genotypes/subtypes. Second-generation inhibitors are in development that may overcome the reduced susceptibility caused by single mutations.

Overall HCV subtype 1a depicts uniformly a lower genetic barrier for resistance than subtype 1b when confronting most HCV protease inhibitors, NS5B non-nucleoside inhibitors and NS5A inhibitors. Broad cross-resistance exists between drugs belonging to the same family, except for NS5B non-nucleoside analogues (NNI) that may exhibit five distinct drug resistance profiles (NNI-1, NNI-2, NNI-3, NNI-4 and NNI-5).

Finally, the large genetic variability of HCV could lead to that some drug resistance changes might exist as natural polymorphisms in certain HCV genotypes/subtypes at rates that may require considering drug resistance testing before recommending certain antivirals.

In this context, this thesis presents four studies to address the following issues:

- The aim of the first study was to examine the prevalence of natural polymorphism associated with resistance to NS3 protease, NS5B polymerase and NS5A protein inhibitors in different genotypes/subtypes from sequences from HCV monoinfected patients obtained from “Los Álamos” HCV database. A high prevalence of natural polymorphisms associated with resistance to DAA was observed in 5790 sequences from protease NS3, NS5B polymerase and NS5A protein. This prevalence was genotype/subtype dependant. The polymorphism C316N associated with resistance to non-nucleoside inhibitors sites 3 and 5, was highly frequent in NS5B sequences from subtype 1b (36%) while it was absent in subtype 1a.

- In the second study we evaluated the prevalence of natural polymorphisms associated with resistance to NS3 protease inhibitors in 55 HIV/HCV co-infected patients from genotype 1. Although prevalence of polymorphisms at positions 36, 155 and 156 were <1%, the polymorphism Q80K, associated with resistance to simeprevir, was found in 20% of NS3 sequences from genotype 1a. Moreover, the prevalence of polymorphisms associated with resistance to HCV protease inhibitors was higher in sequences from subtype 1a than subtype 1b (23% vs. 6, 2%).
- In the third study samples from HIV/HCV co-infected patients naïve for pegIFN/RBV or DAA, and with, at least, 2-years follow-up were collected. Baseline polymorphisms (before antiretroviral therapy begins) and two years after therapy starts were analysed. We found no evidence of the impact of antiretroviral HIV drugs on the variability of HCV NS5B polymerase in HIV/HCV co-infected individuals. Moreover, this study evaluated the presence of natural polymorphism associated with resistance to NS5B polymerase in 61 HIV/HCV co-infected patients. Those polymorphisms associated with resistance to NS5B polymerase non-nucleoside inhibitors were highly frequent in all HCV variants. In HCV genotype 2 patients we found mutations associated resistance to all NNI sites in the NS5B polymerase in a prevalence > 88%. C316N mutation, associated with resistance to non-nucleotide NS5B polymerase inhibitor from sites 3 and 5, was high in genotype 1b patients (36%) while it was absent in genotype 1a. However natural polymorphism associated with resistance to NS5B polymerase nucleoside inhibitors were absent.

- Finally, the fourth study explores the presence of natural changes associated with resistance to the NS5A inhibitor, daclatasvir, in HIV/HCV co-infected patients. These polymorphisms were rarely observed in genotypes 1a, 1b and 3 whereas conversely there were common in genotypes 2 and 4. Moreover, polymorphism Y93H, which confers high level of resistance to daclatasvir was found in 7% of NS5A sequences from genotypes 1b along with L31M which significantly increases the level of resistance. In this study we also compared the genetic barrier for resistance in genotypes 1a vs. 1b. For this purpose we examine the nucleotide composition at critical codons associated with resistance, as well as the number of nucleotides changes requires to acquire resistance to daclatasvir.





# INTRODUCCIÓN

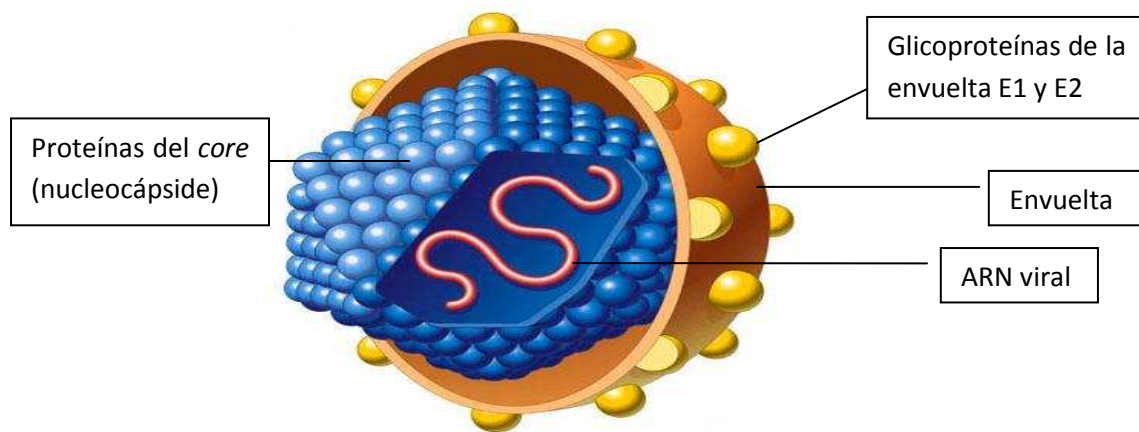
---



## INTRODUCCIÓN

### 1.1 .Estructura molecular del VHC

El virus de la hepatitis C es un virus hepatotrópo que pertenece a la familia *Flaviridae*, género *Hepacivirus* (Choo et al., 1989). Estructuralmente es un virus con envuelta, cuyo diámetro es de 50-60 nm, donde se insertan las glicoproteínas del virus E1 y E2. La envuelta rodea a una nucleocápside en cuyo interior se encuentra el genoma viral (Figura 1).



**Figura 1.** Esquema de la estructura del VHC.

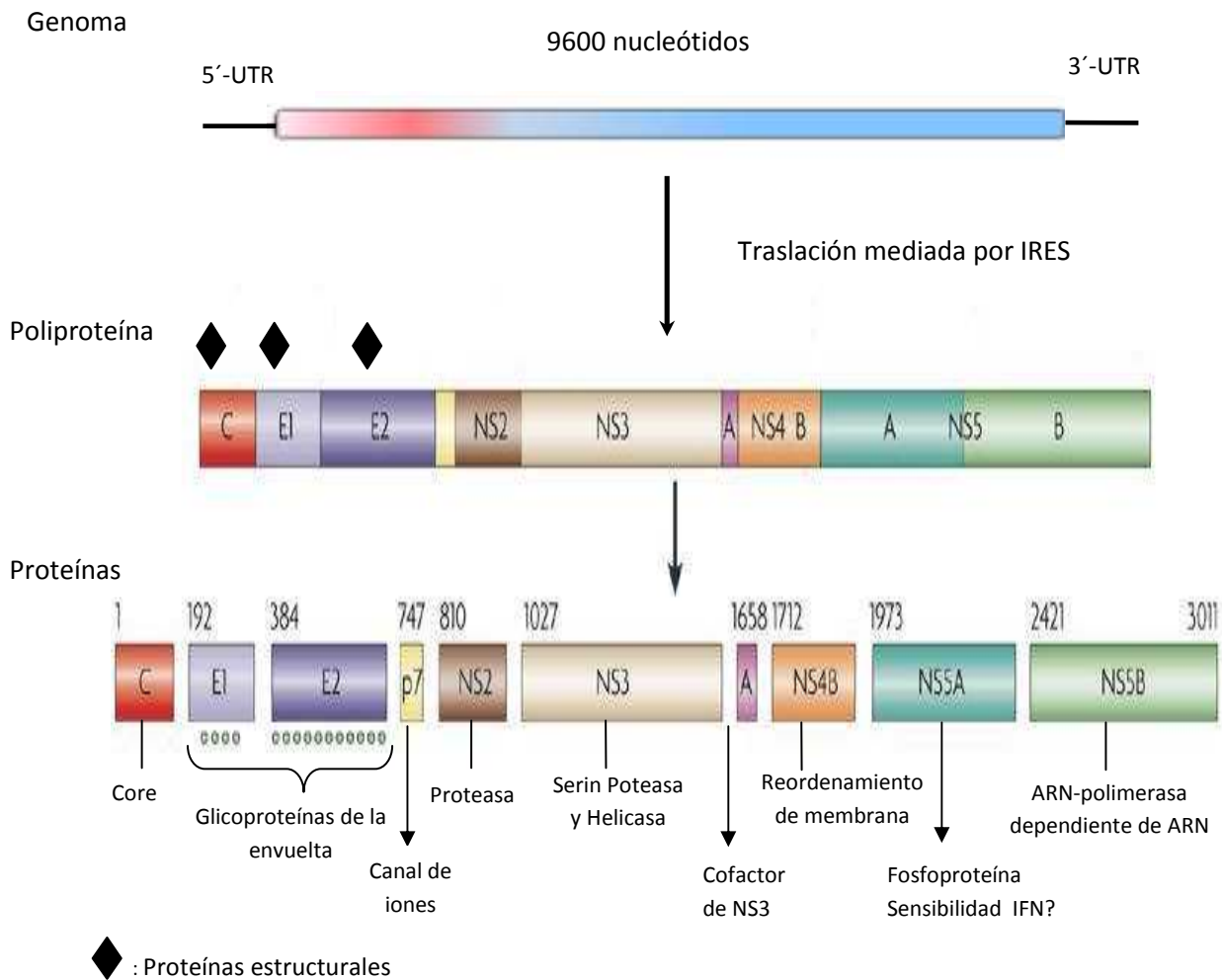
El genoma del VHC está constituido por una cadena de ARN monocatenario de aproximadamente 9600 nucleótidos y de polaridad positiva (Figura 2A). Presenta una amplia región codificante con un único marco de lectura abierta (*open reading frame*, ORF) que codifica para una poliproteína precursora de unos 3000 aminoácidos, con ligeras variaciones dependiendo del genotipo (Penin et al., 2003). La región codificante está flanqueada por dos zonas no codificantes (región no traducible, UTR) que resultan esenciales para la replicación. La región 5'-UTR está altamente conservada y actúa como lugar de entrada del ribosoma (*internal ribosome entry site*, IRES). La región 3'-

UTR presenta una secuencia muy variable entre los diferentes genotipos virales, aunque las estructuras secundaria y terciaria se mantienen conservadas (**Figura 2B**).

El procesamiento enzimático de la poliproteína precursora por las proteasas virales y celulares da lugar a las diferentes proteínas virales tanto estructurales como no estructurales (revisado por [Dustin et al., 2007](#)) (**Figura 2C**):

- Proteínas estructurales: core, E1 y E2. Son proteínas que forman parte de la partícula viral. En el extremo amino-terminal, a continuación del IRES, se encuentra la región que codifica para las proteínas estructurales de la nucleocápside o core (C). La proteína del core representa la región estructural más conservada, de ahí su importancia como componente de los sistemas de diagnóstico. A continuación se encuentran las regiones E1 y E2 que codifican para las glicoproteínas de la envuelta gp33 y gp70, respectivamente, que se caracterizan por presentar una amplia variabilidad genética y por participar en el proceso de entrada viral. Son especialmente variables en las subregiones hipervariables (RHV-1 y RHV-2) localizadas en la región E2/NS1.
- Proteínas no estructurales: p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B. Son aquellas que se expresan exclusivamente en el hepatocito infectado y que están implicadas en el procesamiento de la poliproteína y en la replicación viral. La proteína p7, también llamada viroporina, es un canal de iones. Aunque existe controversia en relación a su función, estudios recientes ([Steinman et al., 2007](#); [Steinman et al., 2010](#); [Vieyres et al., 2013](#)) han visto que promueve la producción de los viriones facilitando el ensamblaje viral. Sin embargo, el

mecanismo por el cual realiza su función todavía se desconoce. El procesamiento de la poliproteína está mediado por la proteasa NS2-3 y la proteasa NS3 serina dependiente. La proteína NS2 también participa en el ensamblaje del virión y forma parte del complejo de replicación junto con NS5A y NS5B. La proteína NS3, después del dominio con actividad serín-proteasa, actúa como una helicasa, capaz de desenrollar el molde de ARN durante la replicación del genoma viral. La proteína NS4 se procesa en dos subunidades, la NS4A parece actuar como cofactor de la actividad serín-proteasa de NS3, mientras que la función de la NS4B se desconoce hasta el momento. La proteína NS5 también se procesa en dos subunidades: A y B. Actualmente se desconoce la función específica de la proteína NS5A aunque se sabe que tiene un papel crítico en la replicación del VHC ([Ross-Thriepland et al., 2013](#)), y que podría estar implicada en la sensibilidad a interferón (IFN), aunque existe cierta controversia a este respecto. La región NS5B posee actividad de ARN-polimerasa dependiente de ARN y es responsable de la replicación viral.



**Figura 2.** Estructura y organización del VHC (adaptado de [Moradpour et al., 2007](#)).

## 1.2 Ciclo replicativo del VHC

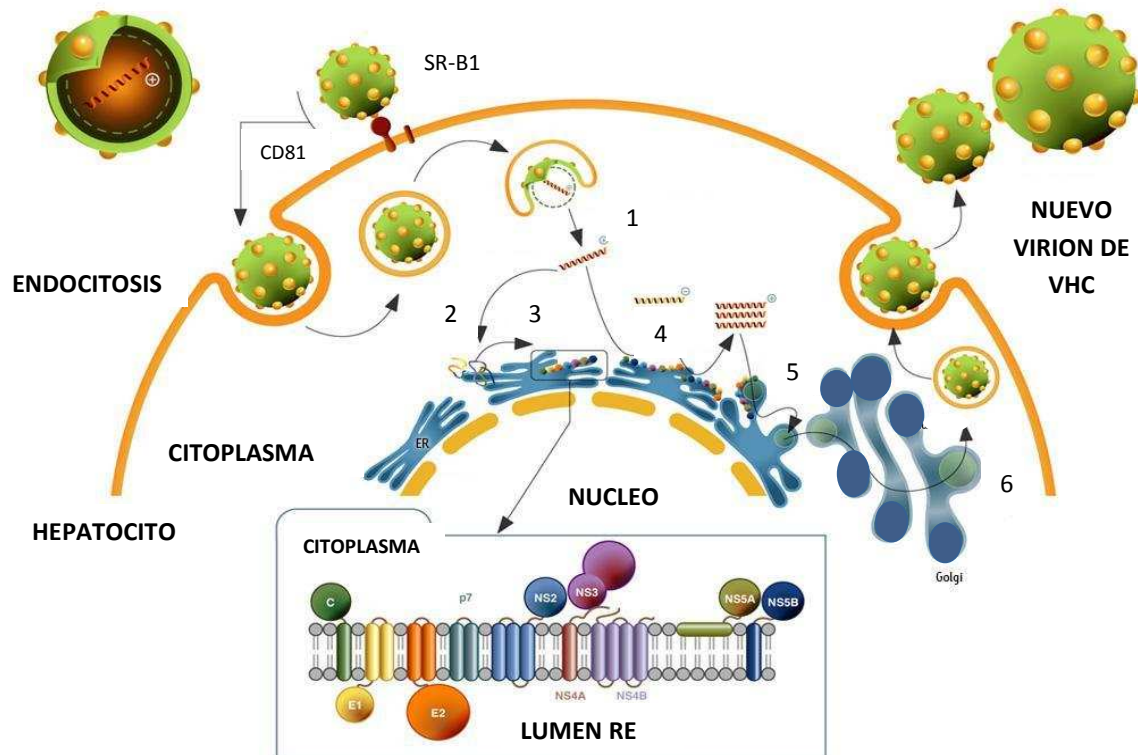
El genoma del VHC no presenta fase de integración en el núcleo de la célula huésped, y todo su ciclo se realiza en el citoplasma del hepatocito, que es su principal diana celular. Por esta razón, la persistencia de la infección por el VHC requiere de la generación continua de nuevas moléculas de ARN viral de forma que los tratamientos que consigan bloquear eficientemente la replicación viral, podrán erradicar la infección por VHC ([Soriano et al., 2008a](#)).

Los mecanismos moleculares específicos que se suceden durante la replicación viral, eran, hasta hace muy poco, prácticamente desconocidos, ya que no existía un modelo de cultivo *in vitro* que permitiera la propagación eficiente del virus. Sin embargo, recientemente se han conseguido avances en el conocimiento de la organización genómica y del ciclo de replicación del VHC gracias al desarrollo de replicones de VHC y de partículas virales infectivas en sistemas de cultivos de tejidos ([Bartenschlager et al., 2006](#)).

Las partículas virales circulan en sangre unidas preferentemente a las lipoproteínas VLDL (*lipoproteínas de muy baja densidad*), LDL (*lipoproteínas de baja densidad*) y HDL (*lipoproteínas de alta densidad*). No se conoce con precisión el mecanismo de entrada del virus, pero se sabe que existe una interacción entre las glicoproteínas de la envuelta E1 y E2 con diferentes moléculas de la membrana del hepatocito que actuarían como receptores. Entre estos posibles receptores se encuentran: el receptor de LDL (LDLR), el receptor Scavenger clase B tipo I (SR-BI) ([Scarselli et al., 2002](#)), la tetraspanina CD81 ([Pileri et al., 1998](#)), la claudina-1 (CLDN1) ([Evans et al., 2007](#)) y las ocludinas (OCLN) ([Ploss et al., 2009](#)). La interacción con estos receptores celulares producen cambios en la estructura de la membrana del hepatocito que finalmente permite la endocitosis dependiente de clatrina. Las moléculas de clatrina provocan la invaginación de la membrana dando lugar a vesículas endosomales. El ambiente ácido del endosoma promueve la reorganización estructural de las glicoproteínas de la envuelta que exponen polipéptidos de fusión. Estos polipéptidos se insertan en las membranas del endosoma para mediar la fusión de las membranas y la liberación de la nucleocápside en el citoplasma ([Huang et al., 2007](#)). A



continuación el virus libera su ARN, cuya traducción se produce por la interacción del IRES con el ribosoma, dando lugar a una poliproteína a nivel del retículo endoplásmico rugoso (**Figura 3, pasos 1 y 2**). Esta poliproteína se procesa por las proteasas virales y celulares (**Figura 3, paso 3**), formando las proteínas virales, que van a quedarse fuertemente unidas a membranas intracelulares, formando de este modo el complejo de replicación asociado a membranas. Dentro de este complejo, la cadena positiva de ARN-VHC se utiliza como molde para la síntesis de la cadena de ARN negativa, y ésta servirá a su vez como molde para la síntesis de nuevas cadenas positivas de ARN que formaran parte de la nueva progenie viral (**Figura 3, paso 4**). Las nuevas copias de la cadena positiva interaccionarán con proteínas del *core* formando la nucleocápside, que adquirirá su envuelta en el lumen del retículo endoplásmico (**Figura 3, pasos 5 y 6**). Por último, los viriones son exportados fuera de la célula a través de los sistemas celulares de excreción (revisado por [Penin et al., 2004](#)).



1) Liberación del genoma al citoplasma del hepatocito, 2) traducción, 3) procesamiento, 4) replicación del genoma, 5) ensamblaje y 6) maduración.

**Figura 3.** Ciclo replicativo del VHC

### 1.3 Variabilidad genética del VHC

El VHC, como en el caso de otros virus ARN, posee una gran heterogeneidad genética incluso más pronunciada que en el caso de la infección por VIH. Hasta el momento, se han descrito 6 genotipos y dentro de ellos diferentes subtipos con una variabilidad global a nivel nucleotídico de hasta un 25%. A este hecho contribuyen diferentes factores como la alta tasa de producción diaria de viriones (alrededor de  $10^{12}$ /día), la elevada población viral existente y la alta tasa de mutación debida a la falta de función correctora de errores de la ARN-polimerasa dependiente de ARN. Estos factores favorecen la generación de una población viral heterogénea formada por genomas virales parecidos pero no idénticos conocidos como cuasiespecies (tasa de error

estimada de  $10^{-3}$  a  $10^{-5}$  mutaciones por nucleótido por genoma replicado) ([Margeridon-Thermet et al., 2010](#)). Dentro del genoma del virus las regiones no codificantes se encuentran relativamente conservadas, mientras que las regiones de envuelta, tienen las tasas de mutación más altas.

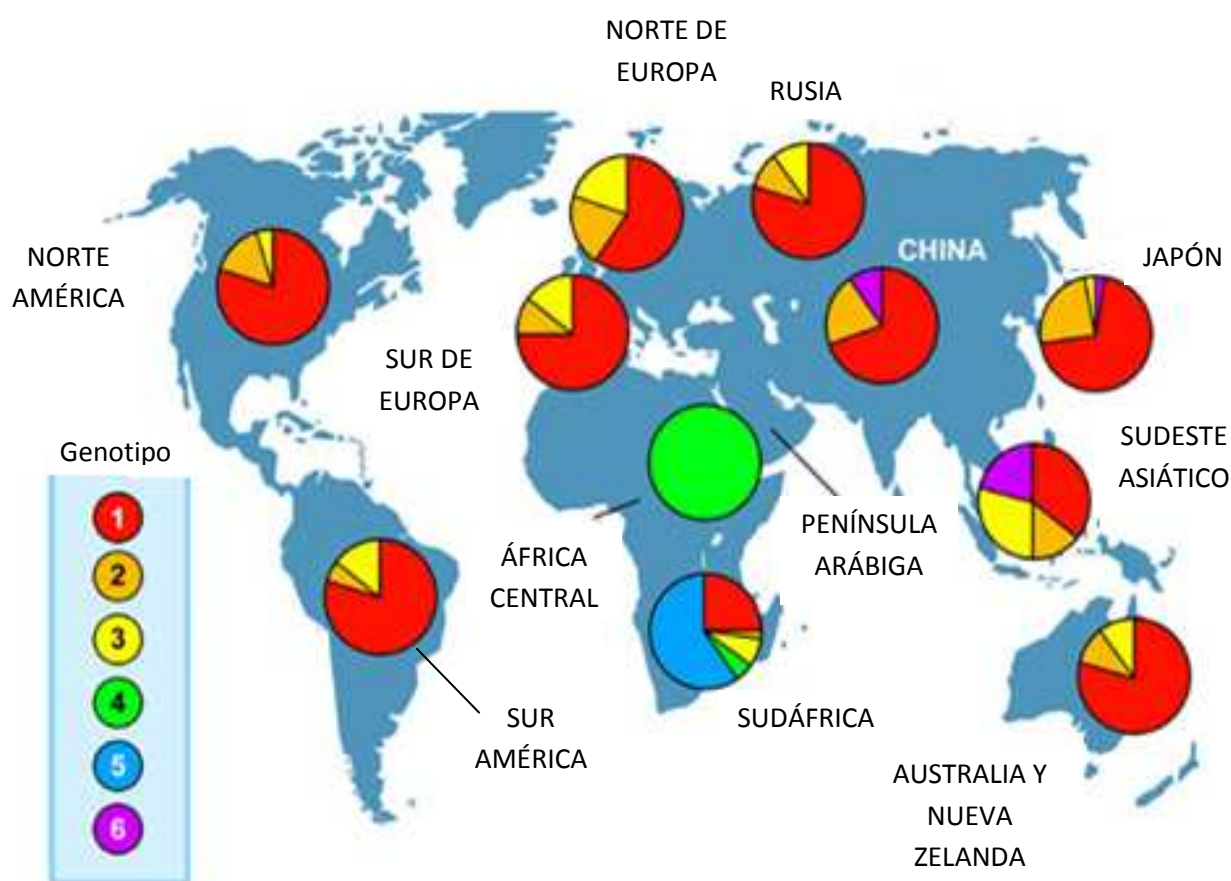
La continua generación de cambios en el genoma viral y la selección por competición de aquellas variantes con mayor eficiencia replicativa dan lugar a una rápida diversificación de las poblaciones virales circulantes y a una alta capacidad de adaptación (revisado por [Dustin et al., 2007](#)).

Dentro del VHC existen distintos niveles de variabilidad genética: genotipos, subtipos y cuasiespecies. El sistema de clasificación actualmente aceptado es el propuesto por [Simmonds et al., 1993](#), donde el VHC se clasifica en seis genotipos (del 1-6), con homología del 60-70%, y dentro de cada uno de éstos, en subtipos, con homología del 78-88%.

La distribución de los genotipos varía en el mundo. Los genotipos 1, 2 y 3 se presentan de manera cosmopolita, mientras que otros genotipos se localizan en zonas geográficas particulares ([Simmonds, 2004](#)) (**Figura 4**).

El genotipo no es utilizado como un marcador pronóstico de progresión de la enfermedad por VHC, ya que no influye sobre el riesgo de cronicidad, la gravedad de la lesión hepática o el desarrollo de alteraciones extrahepáticas. Sin embargo, el genotipo del VHC es un fuerte factor predictivo independiente de la respuesta al tratamiento de la infección por VHC. Los pacientes con genotipo del VHC 1 y 4 responden, en general, un 40% menos que los genotipos 2 y 3 al tratamiento estándar INFpeg/RBV. El

conocimiento del genotipo también es útil para la elección de la duración del tratamiento (Berg, 2008). Además, estudios recientes han observado diferentes tasas de respuesta también entre subtipos genéticos, como es el caso de los genotipos 1a que presentan peores tasas de respuesta que los genotipos 1b.



**Figura 4.** Distribución mundial de los genotipos de VHC  
(Adaptado de Word Health Organization 2009)

#### 1.4 Tratamiento de la infección crónica por VHC

La combinación de Interferón pegilado (IFNpeg) más ribavirina (RBV) era hasta hace muy poco la única opción terapéutica disponible para pacientes con infección crónica (Fried et al., 2002) por VHC. Sin embargo, dicho tratamiento presenta una eficacia

muy limitada; sólo un 40-50% ([McHutchison et al., 2009](#); [Hadziyannis et al., 2004](#)) de los individuos infectados con genotipo 1, el más prevalente en el mundo, alcanzan una respuesta virológica sostenida (RVS). Además del genotipo viral, la coinfección por VIH también modifica las tasas de respuesta (revisado por [Ruiz-Sancho et al., 2006](#)) siendo para pacientes monoinfectados de aproximadamente 55-60% ([Manns et al., 2001](#); [Fried et al., 2002](#)), y para pacientes coinfectados del 28-40% ([Torriani et al., 2004](#); [Carrat et al., 2004](#)). Además, está asociado con efectos adversos importantes como son la depresión y la anemia que muchas veces son limitantes para iniciar tratamiento, de hecho, está contraindicado en personas con problemas neuropsiquiátricos o cirrosis descompensada. Para aquellos pacientes que ya han fracasado con IFNpeg-RBV, el mantenimiento de esta terapia o estrategias de re-tratamiento incrementando el tiempo de duración no han demostrado ser efectivas.

### **1.5 Nuevos Agentes Antivirales de Acción Directa (AAD)**

Los avances en el conocimiento molecular del ciclo de replicación del VHC, han permitido el descubrimiento y desarrollo de diferentes moléculas que bloquean de forma específica proteínas del VHC que son claves para su replicación. Estas moléculas se conocen con el nombre de AAD (*Agentes Antivirales de Acción Directa*) e incluyen principalmente a inhibidores de la proteasa NS3, polimerasa NS5B y de la proteína NS5A. Las principales características de las distintas familias están recogidas en la **tabla 1**.

	Inhibidores de la proteasa NS3	Inhibidores de la polimerasa NS5B análogos de nucleósido	Inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido	Inhibidores de la NS5A
Actividad genotípica	G1 (G1b >G1a) 2nd generación de IP: En todos excepto el G3	Todos los genotipos	G1 (G1b >G1a)	Todos los genotipos (G1b >G1a)
Barrera genética para el desarrollo de resistencias	BAJA (G1b>G1a)	ALTA	BAJA	BAJA (G1b>G1a)
Resistencia cruzada	ALTA	BAJA	Específicas de cada familia	ALTA
Principales mutaciones de resistencia	G1a: R155K, V36M G1b: T54A/S, A156S, I170A	S282T	Específicas de cada familia	M28T,Q30H/R L31M/F/V, P32L, Y93C/H/N

**Tabla 1.** Resumen de las principales características de las distintas familias de AAD (adaptado de [Poveda et al., 2012](#)).

Hasta el momento, los inhibidores de la proteasa NS3, telaprevir y boceprevir son los únicos AAD aprobados para el tratamiento de la infección crónica por VHC genotipo 1 en combinación con INFpeg/RBV. Actualmente se encuentran en fases avanzadas de desarrollo clínico diferentes fármacos pertenecientes a distintas familias con resultados muy prometedores en cuanto a eficacia y seguridad. En general, estos nuevos antivirales han demostrado una extraordinaria actividad antiviral solos o en combinación con INFpeg/RBV, aumentando de forma significativa las tasas de respuesta virológica sostenida (RVS) hasta un 80-100% y reduciendo, en muchos casos, el tiempo de duración del tratamiento ([Soriano et al., 2011](#)). Además, por primera vez se ve factible la curación de la infección por VHC con terapias libres de INFpeg/RBV.

En la **tabla 2** se presenta la relación de fármacos que se encuentran en fases II y III de

desarrollo clínicos y los dos AAD aprobados hasta el momento.

	Fase II	Fase III	Aprobados
Inhibidores de la proteasa NS3	Danoprevir	Simeprevir	Boceprevir
	Sovaprevir	Faldaprevir	Telaprevir
	GS-9256		
	GS-9451		
	ABT-450/r		
	Vaniprevir		
	MK-5172		
Inhibidores de la polimerasa NS5B	Mericitabina	Sofosbuvir	
	IDX-184		
	VX-222		
	BMS-791325		
	ABT-333		
	ABT-052		
	Setrobuvir		
	BI-7127		
	Filibuvir		
	Tegobuvir		
Inhibidores de la NS5A	ABT-267	Daclatasvir	
	GS-5885		

**Tabla 2.** Relación de los AAD que están en fases II y III así como aquellos que están aprobados para el tratamiento de VHC (Adaptado de [Stedman et al., 2013](#)).

#### a) Inhibidores de la proteasa

Telaprevir y boceprevir son los únicos AAD aprobados para el tratamiento de pacientes con infección crónica por VHC genotipo 1 en combinación con INFpeg/RBV. Ambos fármacos son derivados lineares de  $\alpha$ -cetoamidas que se unen covalentemente y de forma reversible a la proteasa NS3/4A con una cinética de unión y disociación lenta. En pacientes naive al tratamiento con interferón, ambos fármacos incrementan de forma significativa las tasas de curación (~70%) y acortan la duración del

tratamiento ([Poordad et al., 2011](#); [Bacon B et al., 2011](#); [Jacobson et al., 2011](#); [Zeuzem et al., 2011](#)). Una de las principales desventaja de estos fármacos es la dosificación: telaprevir, 2 píldoras/8h durante 12 semanas ([Marcellin et al., 2011](#)), y boceprevir, 4 píldoras/8h durante la totalidad de la terapia (24, 36 o 48 semanas). Además, la aparición de efectos adversos como la anemia, rash y los desórdenes gastrointestinales son frecuentes durante el tratamiento con estos fármacos. La actividad antiviral de telaprevir y boceprevir está restringida a infecciones causadas por variantes de genotipo 1 y su eficacia es menor en aquellos pacientes previamente expuestos a INFpeg/RBV (respondedores parciales o no respondedores, fibrosis avanzada, genotipo 1a, y genotipo CT o TT del polimorfismo IL28B ([Stedman et al., 2013](#)).

- **Telaprevir (TVR).** El ensayo clínico *ADVANCE* ([Jacobson et al., 2011](#)) evaluó la eficacia de telaprevir en 1088 pacientes de VHC genotipo 1 en combinación con IFNpeg $\alpha$ /RBV observándose tasas de RVS a semana 12 (RVS<sub>12</sub>) del 75%. Posteriormente en el ensayo *ILLUMINATE* ([Sherman et al., 2011](#)) se comprobó la no inferioridad del tratamiento con terapia triple (TVR + IFNpeg/RBV) durante 24 semanas, frente a 48 semanas en 540 pacientes naïve.

El estudio *REALIZE* ([Zeuzem et al., 2011a](#)) incluyó a pacientes pretratados, con respuesta nula, parcial o que experimentaron una recidiva (*relapsers*) a la terapia con IFNpeg $\alpha$ /RBV. Las tasas de RVS<sub>12</sub> fueron significativamente más altas en los pacientes que recibieron terapia triple en comparación con los que recibieron terapia estándar, especialmente en los *relapsers* previos (86% vs.



24%). El fracaso al tratamiento y la selección de mutaciones de resistencia fue más común en los pacientes no respondedores previos y con cirrosis.

El ensayo *ZENITH* (fase IIa) evaluó 3 ramas de tratamiento combinando de telaprevir con VX-222 (inhibidor de la polimerasa no-análogo de nucleótido-sitio 2) durante 12 semanas, en terapia doble, terapia triple con RBV y terapia cuádruple con IFNpegα/RBV. Posteriormente se completó el tratamiento con 48 semanas de IFNpegα/RBV ([Gane et al. 2012a](#)). Las tasas más altas de respuesta (RVS<sub>12</sub>) se obtuvieron en la rama de terapia cuádruple (90%) seguida de la terapia triple con un 70%. Por el contrario las tasas más bajas de respuesta se obtuvieron en la rama de terapia doble en la que tuvo que pararse el tratamiento por número elevado de recaídas.

- **Boceprevir (BOC).** El estudio *SPRINT-2* ([Poordad et al., 2011](#)) evaluó la eficacia de la terapia triple con boceprevir en pacientes naïve de genotipo 1, mientras que el *RESPOND-2* ([Bacon et al., 2011](#)) evaluó la terapia triple en pacientes no respondedores a IFNpegα/RBV. En todos los casos la administración de boceprevir fue precedida por una fase en la que se administró IFNpegα/RBV en biterapia durante 4 semanas (*lead-in phase*). Esta fase persigue una reducción de la carga viral y una reducción de la probabilidad de seleccionar resistencias a boceprevir. En el *SPRINT-2*, la tasa de RVS fue del 66%, sin diferencias significativas entre los pacientes tratados durante un año y aquellos tratados durante un periodo más corto de acuerdo con la Terapia Guiada por Respuesta

(TGR), que consiste en tratar sólo 24 semanas si alcanzan y mantienen la indetectabilidad desde la semana 4 de iniciar la triple terapia.

Teniendo en cuenta las limitaciones mencionadas anteriormente para telaprevir y boceprevir se está desarrollando una segunda generación de inhibidores de la proteasa en diferentes fases de desarrollo clínico (ej. **asunaprevir, vaniprevir, sovaprevir, danoprevir, simeprevir, faldaprevir, narlaprevir, ABT-450, GS-9256, GS-9451 y MK-5172**). Este grupo de compuestos está formado por inhibidores no covalentes, que en su mayoría muestran actividad antiviral frente a todos los genotipos de VHC, con un perfil de seguridad mejorado y que se administran una vez al día ([Dietrich et al., 2011](#); [Terrault et al., 2011](#); [Fried et al., 2011](#); [Bronowicki et al., 2012](#); [Lawitz et al., 2012a](#)). Además, algunas de estas moléculas, como el MK-5172, muestran una actividad antiviral frente a variantes del VHC portadoras de mutaciones asociadas con resistencia a la primera generación de inhibidores de la proteasa ([Summa et al., 2012](#)).

- **Simeprevir (TMC-435)**. Se administra una vez al día, y ha demostrado una actividad antiviral potente frente a genotipos 1 y de menor potencia para genotipos 2, 4, 5 y 6. El estudio *ASPIRE* (fase IIb) incluyó 462 pacientes pre-tratados de genotipo 1, a los cuales se administró 100mg ó 150mg una vez al día (QD) de simeprevir en combinación con IFNpeg/RBV. Las tasas de respuesta (RVS<sub>24</sub>) fueron del 85%, en el grupo de los *relapsers* y respondedores parciales frente un 51% en el grupo de no respondedores previos ([Zeuzem et al.2012a](#)). Recientemente se han presentado los resultados parciales de tres ensayos en

fase III, en los que se ha administrado 150mg de simeprevir con IFNpeg/RBV a ~392 pacientes de genotipo 1: *QUEST-1* y *QUEST-2* (pacientes naïve), y el ensayo *PROMISE* (previos *relapsers*). A la semana 12 de tratamiento alcanzaban viremia indetectable el 80%, 81% y 79% de los pacientes, respectivamente.

- **Faldaprevir (BI-1335).** Dos ensayos en fase IIb han demostrado la eficacia de Faldaprevir en combinación con IFNpeg/RBV en pacientes con genotipo 1. El primero de ellos fue el *SILEN-C1* (en pacientes naïve). En él se randomizaron los pacientes en 4 ramas de tratamiento. En las dos primeras, se administró durante tres días IFNpeg/RBV (fase de lead-in) y posteriormente 120 ó 240 mg de faldaprevir una vez al día. La tercera rama de tratamiento no tuvo fase de lead-in sino que inició 240mg de faldaprevir y IFNpeg/RBV a la vez. Por último, se incluyó un grupo placebo de pacientes que sólo recibieron IFNpeg/RBV. Todos los grupos recibieron tratamiento durante 24 semanas (**tabla 3**).

Tratamiento y dosis	24 F/P/R RVS	24 F/P/R (TGR) RVS	24 F/P/R +24P/R (TGR) RVS
Faldaprevir 120mg, LI	71%	ND	ND
Faldaprevir 240mg, LI	73%	82%	96%
Faldaprevir 240mg	83%	93%	90%
Placebo	56%	ND	ND

F, faldaprevir; P, placebo; ND, no disponible; R, ribavirina; LI, 3 días de biterapia con IFNpeg/RBV (fase de lead-in); P, IFN pegilado; TGR, terapia guiada por respuesta; RVS, respuesta virológica sostenida.

**Tabla 3.** Resultados del ensayo *SILEN-C1* (Sulkowski et al. 2011a).

El ensayo *SILEN-C2* incluyó a 288 pacientes pre-tratados. Dos grupos de pacientes fueron randomizados a recibir una fase de *lead-in* durante 3 días con

IFNpeg/RBV seguido de terapia con 240mg de faldaprevir una (QD) o dos veces al día (BID). El tercer grupo de pacientes recibió triple terapia (faldaprevir QD + IFNpeg/RBV) sin fase de *lead-in*. En los tres grupos el tratamiento con faldaprevir fue durante 24 semanas, mientras que el grupo que recibió triple terapia una vez al día con lead-in continuó tratamiento con IFNpeg/RBV hasta semana 48 (**tabla 4**).

Tratamiento y dosis	Respondedores parciales	No respondedores	24 F/P/R (TGR)	24 F/P/R + 24 P/R (TGR)
	RVS	RVS	RVS	RVS
Faldaprevir 240mg QD, LI + IFNpeg+RBV	30%	21%	40%	72%
Faldaprevir 240mg QD + IFNpeg+RBV	50%	35%	ND	ND
Faldaprevir 240mg BID, LI + IFNpeg+RBV	42%	29%	ND	ND

F, faldaprevir; LI, 3 días de biterapia con IFNpeg/RBV (fase de lead-in); ND, no disponible; IFNpeg, IFN pegilado; R, ribavirina; P, IFN pegilado, TGR, terapia guiada por respuesta ; RVS, respuesta virológica sostenida; QD, administración una vez al día del inhibidor; BID, administración dos veces al día del inhibidor.

**Tabla 4.** Resultados del ensayo *SILEN-C2* ([Sulkowski et al. 2011b](#)).

#### **b) Inhibidores de la polimerasa análogos de nucleós(t)ido (NI).**

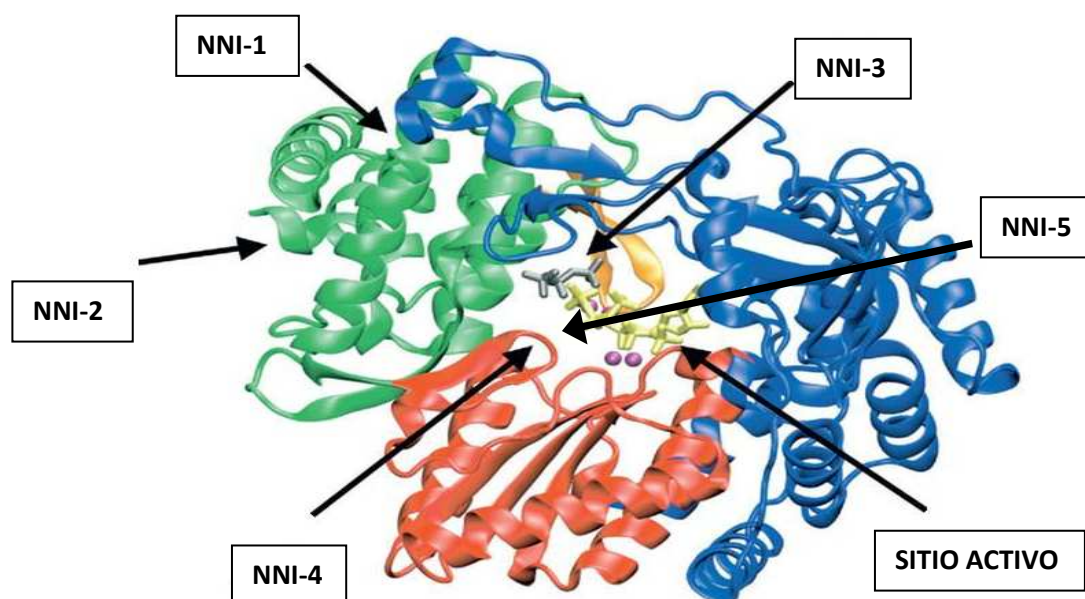
Existen diferentes inhibidores análogos de nucleós(t)ido en desarrollo clínico que inhiben la replicación del VHC uniéndose al sitio activo de la ARN-polimerasa ARN dependiente, y por tanto bloqueando la elongación de la cadena. Esta familia se caracteriza por tener una extraordinaria actividad frente a todos los genotipos del VHC y una barrera genética alta para el desarrollo de resistencias.

- **Mericitabina (RG7128).** Pro-droga oral del análogo de citidina PSI-6130. Este compuesto se convierte a través de la fosforilación de las quinasas celulares al metabolito activo 5-trifosfato, que inhibe la polimerasa NS5B del VHC. Los ensayos *JUMP-C* e *INFORM-1* (primer régimen libre de IFNpeg $\alpha$  para el tratamiento de la infección crónica por VHC) demostraron la seguridad y eficacia de la mericitabina tanto en combinación con terapia standard (*JUMP-C*) como en combinación con danoprevir (*INFORM-1*) ([Pockros et al., 2011](#); [Gane et al., 2010](#)). Además, se han realizado dos estudios de combinación de mericitabina + danoprevir + RBV, que son el *INFORM-SVR* (pacientes naïve) y el *MATTERHORN* (pacientes pretratados) ([Feld et al., 2012](#)) (**Tabla 5**).
- **Sofosbuvir (GS-7977, PSI-7977).** Este fármaco ha demostrado una actividad antiviral muy potente frente a todos los genotipos del VHC así como una barrera genética muy alta para el desarrollo de resistencias ([Nelson et al., 2011](#); [Lawitz et al., 2011a](#), [Rodriguez-Torres et al., 2012](#)). Recientemente, se han publicado parte de los resultados del estudio *ELECTRON*, en el que se ha evaluado sofosbuvir en combinación con RBV en pacientes naïve con genotipos 1, 2 y 3 en pacientes no respondedores (NR) a una terapia previa con IFNpeg $\alpha$ /RBV de genotipo 1 (**Tabla 5**). Aunque en los pacientes NR las tasas de respuesta fueron del 100%, las tasas de recidivas durante el seguimiento (24 semanas tras finalizar el tratamiento) fueron del 90% ([Gane et al., 2013](#)). Con el objetivo de evitar estas altas tasas de recidiva se ha añadido una nueva rama al estudio formada por pacientes naïve y NR a los que se les ha administrado la combinación de sofosbuvir + **GS5885** (inhibidor de la NS5A) + RBV. Añadiendo

este segundo antiviral se han obtenido RVS<sub>12</sub> del 100% sin recidivas 4 semanas post-tratamiento ([Gane et al., 2013](#)).

**c) Inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleós(t)ido (NNI).**

Mientras que los análogos de nucleós(t)idos bloquean la replicación del VHC actuando como terminadores de cadena y por tanto bloqueando la elongación de la cadena de ARN, los no-análogos de nucleósido interaccionan fuera del centro catalítico de la enzima y producen cambios alostéricos comprometiendo su función. Se pueden agrupar en 5 familias (NNI-1, NNI-2, NNI-3, NNI-4 y NNI-5) dependiendo del lugar de la polimerasa al que se unan. En el subdominio *thumb* se encuentran los sitios de unión 1, 2 mientras que en el subdominio *palm* se encuentran los sitios de unión 3, 4 y 5 (**Figura 5**). Dentro de esta familia, los fármacos que se encuentran en fases más avanzadas de desarrollo son **tegobuvir, filibuvir, BI-7127, setrobuvir, VX-222, BMS-791325, ABT-333 y ABT-072**. Todos estos compuestos se caracterizan por presentar de forma generalizada una barrera genética baja para el desarrollo de resistencias sumado a una actividad genotipo/subtipo dependiente.



**Figura 5.** Polimerasa NS5B del VHC. Sitios de unión de los inhibidores de polimerasa no-análogos de nucleósido.

- **Tegobuvir (GS-9190).** Es una imidazopiridina que actúa uniéndose a la  $\beta$ -hairpina en el dominio *thumb* de la polimerasa y que representa el primer inhibidor no análogo de la polimerasa del sitio 5 (NNI-5) (Shih et al., 2011; Hebner et al., 2012). Muestra más potencia antiviral frente a genotipo 1 que sobre el resto de genotipos. Su eficacia ha sido demostrada su eficacia en ensayos donde se ha combinado tegobuvir con un inhibidor de la proteasa (GS-9256) con o sin RBV y con o sin IFNpeg $\alpha$ /RBV durante 4 semanas (estudio QUAD). Todos los pacientes alcanzaron RVR y mantuvieron esta respuesta durante 24 semanas en el grupo de terapia cuádruple (tegobuvir/GS-9256/IFNpeg $\alpha$ /RBV) (Lawitz et al., 2011b; Foster et al., 2011). Siguiendo en esta línea recientemente se han presentado los resultados del estudio *Gilead-QUAD* en el que se trató a los pacientes con tegobuvir en combinación con un inhibidor de la NS5A (GS5885) y un IP (GS9451) con RBV. (Sulkowski et al., 2012) (Tabla 5).

- **Filibuvir (PF-00868554).** Se une no covalentemente al sitio 2 de la polimerasa. En el ensayo en fase II, se administró el fármaco, junto con IFNpeg $\alpha$ /RBV, a 26 pacientes con genotipo 1, dando como resultado reducciones en la carga viral de RNA de  $\sim 2.2$  log IU/mL. Actualmente el fármaco está siendo evaluado en pacientes naïve ([Jacobson et al., 2010](#)).
- **BI-7127.** Inhibidor del sitio 1 de la polimerasa que ha exhibido una actividad antiviral potente contra el genotipo 1 de VHC en los ensayos en fase I ([Larrey et al., 2010a](#); [Larrey et al., 2010b](#)). Los resultados del ensayo en fase IIb *SOUND-C2* (combinación de BI7127+ faldaprevir+ RBV) están recogidos en la **tabla 5** ([Zeuzem et al., 2011b](#); [Zeuzem et al., 2012b](#)). Además, en este estudio pudo observarse una mejor respuesta por parte de los pacientes de genotipo 1b, incluido cirróticos, que por parte de los pacientes con genotipo 1a (83% vs. 60%, respectivamente) ([Soriano et al., 2012](#)).
- **Setrobuvir (ANA598, RG7790).** Inhibidor del sitio 3 de la polimerasa. Los ensayos en fase IIb ( $\sim 275$  pacientes naïve y pre-tratados de genotipo 1) confirmaron: 1) una respuesta antiviral potente, tanto en respondedores parciales y relapsers como en naïve, 2) un buen perfil de seguridad y 3) una alta barrera genética para el desarrollo de resistencias al fármaco. Actualmente está en desarrollo un nuevo estudio sin IFNpeg $\alpha$  llamado *ANNAPURNA*, en el cual se incluirán pacientes de genotipo 1 y se combinará setrobuvir + danoprevir (inhibidor de la proteasa) potenciado con ritonavir + RBV con/sin



mericitabina (inhibidor análogo de nucleósido de la polimerasa) para evaluar RVS a semana 12.

- **ABT-072 y ABT-333.** Se unen al sitio 3 de la polimerasa. En los estudios en fase IIb se combinaron estos dos inhibidores por separado con IFN $\alpha$ /RBV obteniéndose tasas de RVS del 85% y 63%, respectivamente ([Poordad et al., 2012a](#)). La eficacia de estos inhibidores también se ha evaluado por separado en combinación con ABT-450 potenciado con ritonavir (**ABT-450/r**) y RBV en el estudio *PILOT* (ABT-072+ABT-450/r+ RBV) ([Lawitz et al., 2012a](#)) y en el estudio *Co-PILOT* (ABT-033+ABT-450/r+ RBV) ([Poordad et al., 2012b](#)) (**Tabla 5**).
- **BMS-791325.** Inhibidor del sitio 1 de la polimerasa. En los estudios en fase IIa los pacientes que recibieron las dosis más bajas del inhibidor (75 mg dos veces al día) alcanzaron RVS<sub>12</sub> cercanas al 80% ([Tatum et al. 2012](#)).

#### **d) Inhibidores de NS5A**

Se trata de una nueva familia de antivirales que actúan inhibiendo la proteína NS5A. Esta proteína forma parte del complejo de replicación del VHC, aunque se desconocen los mecanismos exactos de acción. Los fármacos de esta familia han demostrado una gran actividad antiviral frente a todos los genotipos.

- **Daclatasvir (BMS-790052).** Es el fármaco en fases más avanzadas de desarrollo clínico, y actúa uniéndose al dominio 1 de NS5A. Ha demostrado una potente actividad antiviral frente a diferentes genotipos del VHC aunque se ha

observado una mayor susceptibilidad al fármaco en los pacientes de genotipo 1b frente a los 1a ([Gao et al. 2010](#)). Recientemente se han presentado los datos de diversos estudios en los que se ha combinado el inhibidor con otros AAD sin IFNpeg $\alpha$  ([Lok et al. 2012](#); [Everson et al. 2012](#); [Sulkowski et al., 2012b](#)) (**Tabla 5**).

- **ABT-267.** En el estudio *AVIATOR* (pacientes de genotipo 1 naïve y no respondedores a la terapia previa con IFNpeg $\alpha$ ), se combinó la terapia con ABT-450/r +ABT-267 +ABT-333 +RBV. La RVS<sub>12</sub> post-tratamiento en ambos grupos fueron cercanas al 100% ([Kowdley et al. 2012](#)) (**Tabla 5**).

Estudio	Pacientes	Tratamientos	Familia de fármacos	RVS(%)
<b>AI444-04</b>	G1, Naïve	Daclatasvir, sofosbuvir	NS5A, NI	100*
	G1, Naïve	Daclatasvir, sofosbuvir, RBV	NS5A, NI, RBV	100*
	G2, G3, Naïve	Daclatasvir, sofosbuvir	NS5A, NI	88–100*
	G2, G3, Naïve	Daclatasvir, sofosbuvir, RBV	NS5A, NI, RBV	86*
<b>SOUND-C2</b>	G1a, Naïve	Faldaprevir, BI7127, RDV	IP, NNI, RDV	43‡
	G1b, Naïve	Faldaprevir, BI7127, RBV	IP, NNI, RBV	83‡
	G1, cirrhotic	Faldaprevir, BI7127, RBV	IP, NNI, RBV	54–57‡
<b>Co-PILOT</b>	G1, Naïve	ABT-450r, ABT-333, RBV	IP, NNI, RBV	95‡
	G1, NR	ABT-450r, ABT-333, RBV	IP, NNI, RBV	47‡
<b>PILOT</b>	G1, Naïve	ABT-450r, ABT-072, RBV	IP, NNI, RBV	91‡
<b>INFORM-SVR</b>	G1, Naïve	Danoprevir, mericitabine	IP, NI	Stop
	G1, Naïve	Danoprevir, mericitabine, RDV	IP, NI, RDV	41‡
<b>Gilead-QUAD</b>	G1, Naïve	GS9451, GS5885, GS9190	IP, NS5a, NNI, RBV	100‡
<b>ELECTRON</b>	G1, naïve	Sofosbuvir, RBV	NI, RBV	88*, 84‡
	G1, naïve	GS5885, RBV	NS5a, RBV	100*
	G2, G3, naïve	Sofosbuvir, RBV	NI, RBV	100‡
	G1, TE	Sofosbuvir, RBV	NI, RBV	10*, 10‡
	G1, TE	GS5885, sofosbuvir, RBV	NS5a, NI, RBV	100*
	G2, G3, TE	Sofosbuvir, RBV	NI, RBV	80*, 68‡
<b>AVIATOR</b>	G1, naïve	ABT450r, ABT267, ABT333, RDV	IP, NS5a, NNI, RDV	97‡
	G1, TE	ABT450r, ABT267, ABT333, RBV	IP, NS5a, NNI, RBV	36‡
<b>Triple DAA</b>	G1, naïve	Asunaprevir, daclatasvir, DMS-791325	IP, NS5a, NNI, RBV	94*, 94‡
<b>Lok et al.</b>	G1, TE	Asunaprevir, daclatasvir	IP, NS5a	36‡
<b>MATTERHORN</b>	G1b, TE	Danoprevir/r, mericitabine, RBV	IP, NI, RBV	39–55‡

IP, inhibidores de la proteasa; TE, pacientes pretratados (incluye respondedores parciales, y no respondedores previos); NNI, (*non-nucleoside inhibitors*) inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido; NI, (*nucleoside inhibitors*) inhibidores de la polimerasa análogos de nucleósido; danoprevir/r, danoprevir potenciado con ritonavir; ABT-450/r, ABT-450 potenciado con ritonavir; \*, RVS a semana 4; ‡, RVS a semana 12.

**Tabla 5.** Tratamientos combinados en desarrollo clínico sin IFN  
(Adaptado de [Dabbouseh et al. 2013](#))

## 1.6 Resistencias a los AAD.

La selección de resistencias a los AAD es el resultado de una incompleta supresión de la replicación viral en presencia de estos fármacos. Existen diversos factores que pueden favorecer este fenómeno como son: la alta tasa de replicación del VHC, la baja fidelidad de copia, ausencia de actividad correctora de errores de su polimerasa, una potencia antiviral sub-óptima del fármaco, una barrera genética baja para la

resistencia y una mala adherencia del paciente a la terapia. Cuando se consigue una inhibición completa de la replicación del VHC, el escape y el enriquecimiento de la población viral con variantes resistentes no es posible ([Domingo et al., 2007](#); [Franco S et al., 2007](#); [Kieffer et al., 2010](#))

En general, y con la excepción de los inhibidores de la polimerasa análogos de nucleósido, los AAD se caracterizan por presentar una barrera genética baja para el desarrollo de resistencias. De esta forma, la actividad antiviral de estos fármacos puede verse comprometida por la selección de una única mutación en el genoma viral. De hecho, en fases iniciales de los ensayos clínicos se ha observado que el tratamiento con algunos AAD en monoterapia puede favorecer la rápida selección de resistencias en el VHC y el fracaso terapéutico ([Kieffer et al., 2010](#); [Sarrazin et al., 2007](#)).

Se pueden observar además claras diferencias en cuanto a respuesta en función del subtipo viral. En general, los pacientes infectados con el genotipo 1a del VHC son los que experimentan un mayor número de fracasos terapéuticos y presentan una barrera genética más baja para la selección de resistencias comparado con los pacientes infectados con el genotipo 1b ([Jacobson et al., 2011](#); [Sherman et al., 2011](#); [McCown et al., 2009](#); [Kieffer et al., 2011](#); [Gao et al., 2010](#); [Fridell et al. 2010](#)).

#### **a) Resistencia a inhibidores de la proteasa**

La resistencia a la primera generación de inhibidores de la proteasa se caracteriza por la selección de mutaciones en las posiciones 36, 54, 55, 155, 156 y/o 170 (**Tabla 6**).

El perfil de resistencias está influenciado por el subtipo genético. Mientras que los pacientes infectados con el subtipo 1a, seleccionan principalmente mutaciones en la posición 155, aquellos infectados con el subtipo 1b lo hacen por la selección de cambios en las posiciones 36, 54, 55, 156, y 170. Esta diferente vía para la selección de resistencias podría explicarse porque el subtipo 1b del VHC necesita 2 cambios nucleotídicos en la posición 155 para producir resistencia (R155K: CGG a AAG) mientras que solamente se requiere un cambio para el subtipo 1a (R155K: AGG a AAG). Esta observación se traslada a la práctica clínica con una mayor barrera genética para la resistencia del subtipo 1b que para 1a ([Kieffer et al., 2010](#); [Sarrazin et al., 2010](#))

Existe en general una amplia resistencia cruzada entre los inhibidores de la proteasa. Sin embargo, los cambios seleccionados en los fracasos a telaprevir y boceprevir no son exactamente los mismos que los observados en los fracasos a la segunda generación de inhibidores de la proteasa (p.ej. danoprevir, vaniprevir, simeprevir, o BI-1335) (**Tabla 6**). MK-5172 es un nuevo inhibidor de proteasa en desarrollo que presenta actividad antiviral frente a variantes del VHC que presentan las mutaciones V36A/M, T54A/S, R155K/Q/T, A156S, V36M+R155K o T54S+R155K. Además, MK-5172 ha demostrado actividad frente a todos los genotipos del VHC ([Graham et al., 2011](#)).

	V36A/M	T54S/A	V55A/K	Q80R/K	R155K/T/Q	A156S/D/T/V	D168A/V/T/H	V170A/T
Telaprevir, G1a	M				K/T			
Telaprevir, G1b	A				Q			
Boceprevir, G1a	A/M				K/T			
Boceprevir, G1b								
Faldaprevir								
Danoprevir								
Vanoprevir								
Simeprevir								
Asunaprevir								
GS9451/9256					*	*	*	
ABT-450								
Sovaprevir								

GT1a: mutaciones observadas en pacientes en genotipo 1a; GT1b: mutaciones observadas en pacientes en genotipo 1b; \*: Resistencias sólo observadas *in vitro*

**Tabla 6.** Mutaciones en la proteasa NS3 del VHC asociadas con resistencia a los inhibidores de la proteasa lineares (cajas azules) y macrocíclicos (cajas verdes)  
(Adaptado de [Vermehren et al. 2012](#)).

### **b) Resistencia a inhibidores de la polimerasa análogos de nucleósidos**

Esta familia se caracteriza por presentar una barrera genética muy alta para el desarrollo de resistencias. *In vitro*, las mutaciones de resistencia se seleccionan dentro o cerca del sitio catalítico de la polimerasa del VHC (p.ej. S282T). La selección de estas mutaciones tiene un impacto muy negativo en la capacidad replicativa del virus. Probablemente, esta sea la razón por la que estas mutaciones sólo se había observado en estudios *in vitro*, y los fracasos virológicos a estos fármacos se producen, en general, en ausencia de la selección de la mutación S282T ([Kieffer et al., 2010](#); [Sarrazin et al., 2010](#)). Hasta el momento, esta mutación sólo ha sido seleccionada *in vivo* por un

paciente con genotipo 2b que fracasó al tratamiento con sofosbuvir en monoterapia (Gane et al., 2013).

En cuanto a respuesta al tratamiento en función del subtipo viral, las diferencias en cuestión de selección de resistencias entre pacientes de genotipo 1a ó 1b varían en función del análogo utilizado (McCown et al., 2008). En el estudio *ELECTRÓN*, los pacientes obtuvieron tasas de respuesta a la semana 12 de tratamiento con sofosbuvir del 100%, a pesar de que el 89% eran pacientes genotipo 1a (Gane et al., 2013). Por el contrario, en el estudio *INFORM-SVR* (mericitabina con danoprevir con o sin RBV) la tasa de respuesta (RVS 12) fue más baja en los pacientes con genotipo 1a (26%) frente a los 1b (71%)(Gane et al., 2012b).

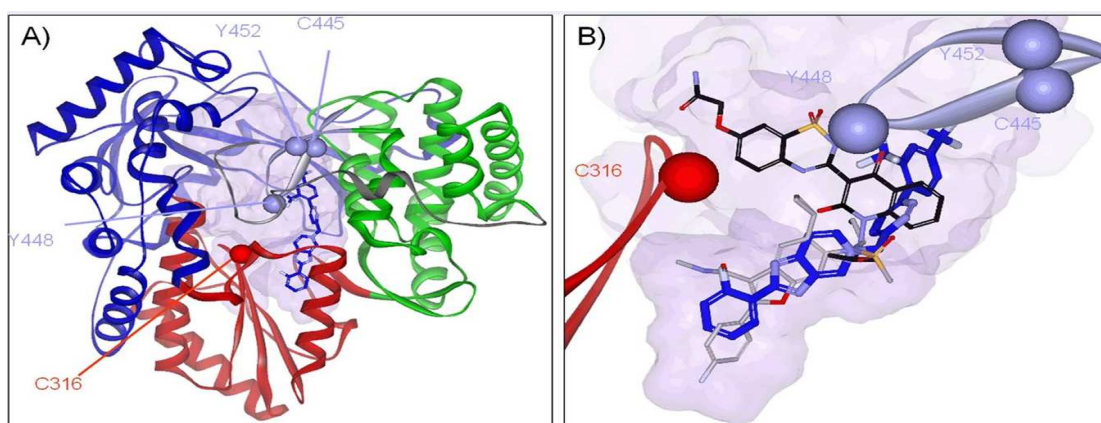
PSI-938, representa la segunda generación de análogos de nucleós(t)idos en desarrollo con actividad antiviral frente a variantes del VHC portadoras de la mutación S282T. Estudios *in vitro* han identificado una serie de mutaciones en la polimerasa NS5B asociados con resistencia a este fármaco (S15G, R22Q, C223Y/H, L320I, y V321I). Estas mutaciones por sí solas no confieren resistencia y es necesaria la combinación de al menos 3 mutaciones para incrementar la  $IC_{50}$  >10-veces (Lam et al., 2011).

### **c) Resistencia a inhibidores de la polimerasa no-análogos de nucleósidos**

Como se ha mencionado anteriormente, la polimerasa del VHC presenta al menos 5 sitios de unión para compuestos que puedan bloquear su actividad por un mecanismo de inhibición alostérica. Estos sitios de unión están localizados en la región *thumb* (sitios 1 y 2) y *palm* (sitios 3, 4 y 5) del modelo con forma de mano de la polimerasa del VHC. Los cambios que confieren resistencia a cada clase de inhibidor están bien

caracterizados no existiendo prácticamente resistencia cruzada entre los inhibidores de distintas familias (Bressanelli et al., 2002; De Francesco et al., 2007) (Tabla 7).

Sin embargo, existen algunos perfiles de resistencia solapantes, como son la selección de las mutaciones C316Y/N y Y448H que están asociadas a resistencia en los compuestos que se une a los sitios 3-5 (Figura 6) (Shih et al. 2011).



**Figura 6.** A) Estructura de la polimerasa NS5B del VHC: dominio *palm* (rojo), *thumb* (verde), *finger* (azul) y  $\beta$ -hairpina (malva). B) Sitio de unión de tegobuvir a la polimerasa NS5B (sitio 3) y mutaciones asociadas con resistencia a tegobuvir. (Shih et al. 2011).

Las mutaciones de resistencia a NNI-1 (ej. y BI-7127) se seleccionan en las posiciones 494 a 496. Las mutaciones en las posiciones 419, 422, 423, 482 y 494 están asociadas a resistencia a NNI-2 (ej. filibuvir). Los cambios en las posiciones 316, 368, 414, 554, 556 y 559 están asociados a resistencia a NNI-3. La resistencia a compuestos NNI-4 se ha asociado a mutaciones en las posiciones 316, 365 y 448. Finalmente la resistencia al sitio 5 donde se une por ejemplo Tegobuvir se caracteriza por desarrollar resistencias en las posiciones 316, 445, 452 y 448 (Tabla 7).



	C316 Y/N	S368 T	M414 T/I/V/L	A421 V	L419 S	R422 K	M423 T/I/V/T	C445 F	Y448 C/H	I482 L/V/T	A486 A/I/V/T/M	V494 A	P495 S/Q/L/A/T	V499 A	G554 D/S	S556 G	D559 G
BI 207127																	
BMS-791325																	
Filibuvir																	
VX-222							*			*							
Setrobuvir		*	*												*	*	*
ABT-333																	
ABT-072	*	*	*													*	
Tegobuvir																	

Sitios de unión del inhibidor a la polimerasa: NNI-1 (naranja), NNI-2 (azul), NNI-3 (verde), NNI-5 (morado). \* Mutaciones asociadas con resistencia *in vitro*.

**Tabla 7.** Mutaciones en la polimerasa NS5B asociadas con resistencia a los inhibidores de la polimerasa no-análogos de nucleósido (Adaptado de [Vermehren et al. 2012](#)).

#### d) Resistencia a inhibidores de NS5A

El perfil de resistencias a daclatasvir ha sido recientemente caracterizado *in vitro*. Las mutaciones de resistencias se han descrito en la región N-terminal del dominio 1 de NS5A en las posiciones 28, 30, 31, 32, y 93. Como se ha identificado para otras familias de fármacos, el perfil y el grado de resistencia son diferentes para el subtipo 1a y 1b del VHC. El subtipo 1b presenta una barrera genética más alta para la resistencia y el impacto de las mutaciones en la pérdida de susceptibilidad es menor que para el subtipo 1a ([Gao et al., 2010](#); [Fridell et al., 2010](#)) (Tabla 8).

Existe una alta resistencia cruzada para los inhibidores de NS5A que están en desarrollo, ya que la resistencia a estos compuestos se caracteriza por la selección de las mutaciones L31V/F y Y93H ([Lawitz et al., 2012b](#); [Wong et al., 2012](#)).

	M28T	Q30E/R	L31F/M/V	Y93C/H/N
<b>Daclatasvir, GT1a</b>				
<b>Daclatasvir, GT1b</b>				
<b>GS-5885</b>				
<b>ABT-267</b>				

GT1a: mutaciones observadas en pacientes en genotipo 1a; GT1b: mutaciones vistas en pacientes en genotipo 1b.

**Tabla 8.** Mutaciones en la proteína NS5A asociadas con resistencia al inhibidor de la NS5A, daclatasvir ([Vermehren et al. 2012](#)).

## 1.7 Otros fármacos en desarrollo frente al VHC

A parte de los AAD, existen otros compuestos que se están desarrollando para el tratamiento del VHC. Estos fármacos actúan inhibiendo proteínas celulares implicadas en el ciclo de replicación.

- Alisporivir (DEB-025): Inhibidor de las ciclofilinas que presenta actividad frente a todos los genotipos del VHC, se encontraba en fase III ([Coelmont et al., 2010](#); [Fernandes et al., 2010](#)). Su desarrollo se interrumpió recientemente por la muerte de un paciente por pancreatitis en los estudios fase III.
- Miravirsén: Primer fármaco cuya diana es un micro-RNA que está en ensayos clínicos. Ha sido diseñado para que reconozca y “secuestre” miR-122, un microRNA específico del hígado que requiere el VHC para replicarse. En el

ensayo en fase II que ha evaluado miravirsén en monoterapia en pacientes de genotipo 1. Una inyección semanal subcutánea durante 5 semanas de miravirsén produjo una reducción dosis-dependiente de carga viral del VHC de entre 2-3 log UI/ml. Esta reducción de carga viral se mantuvo transcurridas 4 semanas después de finalizar la administración del fármaco ([Janssen et al., 2013](#)).

## **OBJETIVOS**

---



Los nuevos antivirales de acción directa (AAD) para el tratamiento de la infección por el virus de la hepatitis C (VHC) incluyen inhibidores de la proteasa NS3, la polimerasa NS5B y la proteína NS5A. Estos fármacos presentan una potente actividad antiviral y aumentan de forma significativa la respuesta virológica en los pacientes con infección crónica por VHC. Sin embargo, la rápida selección de mutaciones de resistencia representa una amenaza para el éxito del tratamiento con estos fármacos. Además, la eficacia de los AAD parece depender del genotipo y del subtipo del VHC, puesto que la presencia de polimorfismos genéticos naturales en la proteasa NS3, la polimerasa NS5B y la proteína NS5A puede comprometer la actividad de estos antivirales. Por tanto, es importante conocer la prevalencia de estos polimorfismos asociados a resistencia a los AAD en diferentes geno/subtipos del VHC en pacientes con hepatitis crónica C. También es de relevancia saber si existen diferencias en la prevalencia de estos cambios genéticos en pacientes coinfectados por el VIH, dada la frecuencia de la coinfección. En este contexto se ha desarrollado esta tesis con los siguientes objetivos:

1. Examinar la variabilidad genética y la prevalencia de cambios en posiciones asociadas a resistencia a los AAD en las secuencias de la proteasa NS3, la polimerasa NS5B y la proteína NS5A en diferentes genotipos y subtipos del VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC que son atendidos en nuestro hospital y en secuencias de pacientes mono infectados por el VHC recogidas en la base de datos de Los Álamos.
2. Analizar el posible impacto de la terapia antirretroviral para el tratamiento de la infección por VIH en la variabilidad genética de la polimerasa NS5B del VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC.



## **PACIENTES Y MÉTODOS**

---





## **2.1. Población de estudio**

Los pacientes incluidos en esta tesis son en su mayor parte pacientes crónicamente coinfectados con VIH+ y VHC en seguimiento clínico en el Servicio de Enfermedades Infecciosas del Hospital Carlos III de Madrid. Para el estudio 3 se incluyeron además pacientes en seguimiento en el Hospital de Valme de Sevilla.

Para el estudio 1 se analizaron secuencias obtenidas de la base de datos de los Álamos, que son en su gran mayoría pertenecientes a pacientes monoinfectados crónicamente con VHC.

Las características específicas de los pacientes seleccionados se describirán en detalle en cada uno de los estudios que forman parte de esta tesis.

## **2.2. Recogida de muestras de plasma**

Las muestras de plasma se obtuvieron a partir de sangre de los pacientes por punción venosa en tubos Vacutainer con EDTA como anticoagulante coincidiendo con su extracción rutinaria para su seguimiento clínico. El plasma libre de células fue aislado por centrifugación a 800g durante 10 minutos. Las muestras de plasma se almacenaron en alícuotas de 1,5 mL a -20°C hasta su utilización.

## **2.3. Determinación de la carga viral plasmática del VIH**

La carga viral del VIH se determinó en muestras de plasma mediante el ensayo Branched DNA Assay Versant 3.0 (Siemens, Barcelona, España) con un límite de detección de hasta 50 copias/mL de ARN-VIH.

#### **2.4. Determinación de la carga viral plasmática del VHC**

La carga viral del VHC se determinó en muestras de plasma mediante el ensayo cuantitativo real-time-PCR de Abbott (Abbott Laboratorios, Madrid, España) con un límite de detección de 10 UI/ml.

#### **2.5. Determinación del genotipo del VHC**

En los pacientes virémicos el genotipo del VHC se determinó utilizando el ensayo de LiPA versión 2.0 (Innogenetics, Gante, Bélgica). Este ensayo emplea el producto de ADN (ácido desoxirribonucleico) generado por la amplificación mediante RT-PCR de las regiones 5'UTR y core del ARN del VHC, que se hibrida con sondas de oligonucleótidos inmovilizadas en una tira de nitrocelulosa y que son específicas de las regiones 5'UTR y core de los diferentes genotipos del VHC.

#### **2.6. Extracción del ARN viral**

La extracción del ARN viral se llevó a cabo a partir de 500 µL de plasma utilizando el kit comercial QUIA® RNA Blood Mini Kit (Quiagen, Hilden, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante. El ARN obtenido, se eluyó en un volumen final de 60 µL y se almacenó a -80°C hasta su utilización.

#### **2.7. Amplificación de la proteasa NS3, NS5A y polimerasa NS5B**

La amplificación de las tres regiones del genoma se realizó mediante RT-PCR y posterior nested PCR, usando los kits One Step® RT PCR System (Quiagen, España) y Hot Start® Master Mix Kit (Quiagen, España), respectivamente. Las cantidades de cada componente de las mezclas fueron las siguientes:

### **PRIMERA PCR (RT-PCR)**

<b>Mezcla de reacción por muestra</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Buffer 5x	10µl
Mix de la encima	2 µl
DNTP mix	2 µl
Agua	24 µl
Cebador Forward	1 µl
Cebador Reverse	1 µl
ARN	10 µl
<b>Total</b>	<b>50 µl</b>

El amplicón obtenido de la primera PCR (ADNc) fue usado para la segunda PCR (nested PCR).

### **Nested PCR**

<b>Mezcla de reacción</b>	
<b>Reactivo</b>	<b>Cantidad</b>
Hot Star	25 µl
Cebador Forward	1 µl
Cebador Reverse	1 µl
Agua	18 µl
cADN	5 µl
<b>Total</b>	<b>50 µl</b>

Las condiciones así como los cebadores empleados para las PCRs fueron específicas de cada región del genoma y de cada genotipo/subtipo del VHC y se describirán en detalle en cada uno de los estudios que forman parte de esta tesis.

## 2.8. Visualización y purificación de los amplicones de PCR

La presencia del amplicón en producto de la nested PCR se analizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% con posterior tinción con bromuro de etidio, visualizando los resultados bajo luz ultravioleta.

En el caso de amplificación positiva, el amplicón se purificó utilizando el kit comercial High Pure PCR Product Purification Kit (Roche, Mannheim, Alemania) siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.9. Secuenciación

El producto de PCR purificado fue secuenciado en ambas direcciones utilizando el kit ABI PRISM dRhodamine Dye Terminator Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Foster City, USA) en el secuenciador automático ABI PRISM 3100 (Applied Biosystems, Foster City, USA). Los cebadores empleados en la reacción de secuencia fueron los mismos usados en cada caso para la nested PCR. En este caso las condiciones de la reacción de secuencia fueron:

Mezcla de reacción	
Reactivo	Cantidad
Rodamina (Premix)	4 µl
DMSO	0,5 µl
Cebador Interno (3,2µM )	2 µl
Amplicón purificado	5 µl
Agua	13,5 µl
Total	25 µl

Perfil térmico	
Temperatura	Tiempo
94º	3 min
96º	10 seg
50º	5 seg
60º	4 min
4º	∞

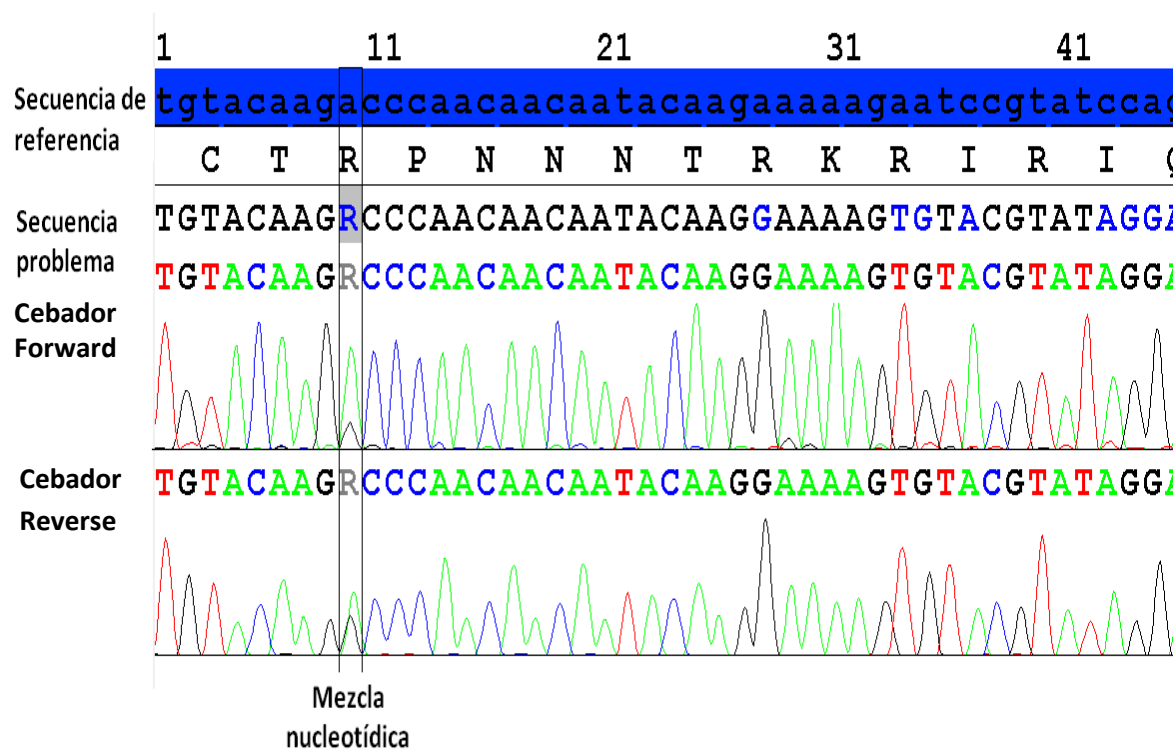
25 ciclos

El producto de la reacción de secuencia se procesó utilizando una precipitación basada en NaOH y alcohol, tras la cual se re-suspendió el producto en formamida para su

posterior análisis en el secuenciador automático ABI PRISM 3100 siguiendo las instrucciones del fabricante.

## 2.10. Análisis de las secuencias

Todas las secuencias se analizaron con SeqScape v2.5 (Applied Biosystems); programa que alinea y orienta automáticamente los dos electroferogramas de cada muestra. Se consideró la existencia de mezcla nucleotídica en una posición determinada cuando en el electroferograma el pico secundario alcanzaba al menos el 25% de la altura del pico principal (**figura 6**).



**Figura 7.** Análisis de secuencias e identificación de mezclas nucleotídicas

### **2.11. Datos epidemiológicos y marcadores biológicos**

Los datos epidemiológicos de los pacientes incluidos en esta tesis fueron género, edad, nacionalidad, ruta de transmisión. Los marcadores biológicos utilizados fueron la carga viral del VIH, carga viral VHC, genotipo de VHC y el recuento de linfocitos T CD4+. Otros parámetros analizados incluyeron la exposición antirretroviral previa.

### **2.12. Análisis estadístico**

Las características basales de las poblaciones de estudio se expresaron como medias ( $\pm$  desviación estándar) o medianas [rango intercuartil]. En todos los estudios se comprobó la normalidad en la distribución de las diferentes variables cuantitativas mediante el test de Kolmogorov-Smirnov.

## **ESTUDIO 1:**

---

**Impacto de la variabilidad genética en la proteasa NS3, polimerasa NS5B y la proteína NS5A en la respuesta a los nuevos AAD.**

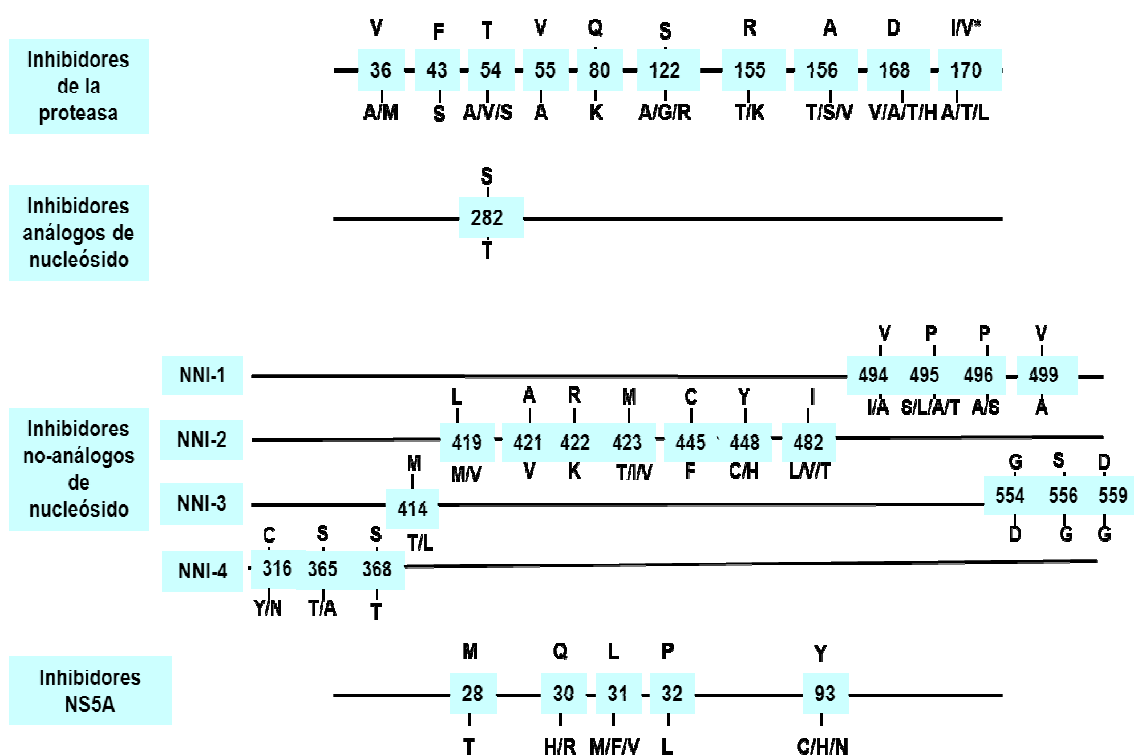




### 3.1 Objetivo y diseño del estudio

El objetivo del estudio fue, evaluar la prevalencia de polimorfismos naturales asociados a resistencia a inhibidores de la proteasa NS3, polimerasa NS5B y la proteína NS5A en diferentes genotipos y subtipos del VHC y su potencial impacto en la respuesta a los AAD.

Para ello, se consideraron las principales mutaciones asociadas con resistencia a los distintos AAD identificados hasta el momento (**figura 8**).



**Figura 8.** Mutaciones en la proteasa NS3, polimerasa NS5B y la proteína NS5A asociadas con resistencia a los AAD. (Adaptado y actualizado de [Sarrazin et al., 2010](#)).

### **3.2 Pacientes y métodos**

#### **3.2.1 Población de estudio**

Se obtuvieron secuencias de la proteasa NS3, polimerasa NS5B y la proteína NS5A del VHC de la base de datos de “Los Álamos” (<http://hcv.lanl.gov/content/index>). Esta base de datos está constituida por pacientes VHC positivos, naïve para el tratamiento con AAD en el momento del estudio y en su mayoría monoinfectados. Para este estudio, las secuencias obtenidas fueron de genotipos 1, 2, 3 y 4.

#### **3.2.2 Análisis de las secuencias**

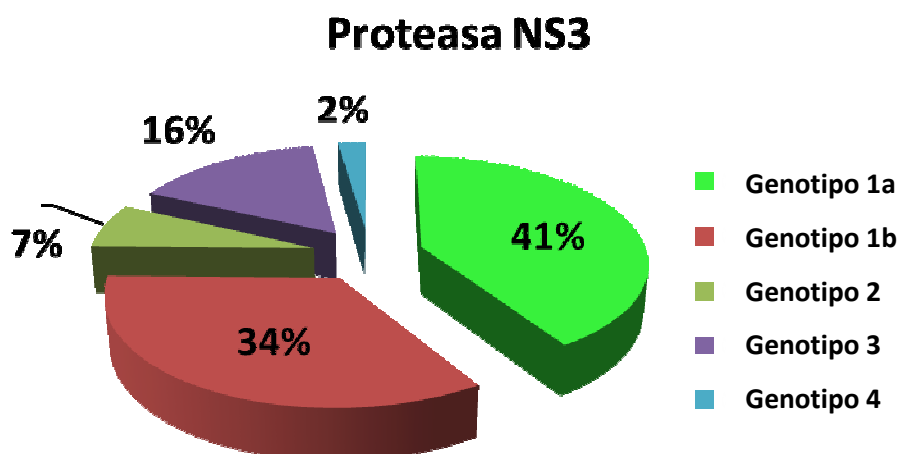
Las secuencias obtenidas se alinearon por genotipos y regiones con el programa clustalx.msi. A partir de ese alineamiento se examinaron los polimorfismos asociados con resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3, polimerasa NS5B y la proteína NS5A (Sarrazin et al., 2010), y 6 mutaciones adicionales (S15G, S96T, R222Q, C223Y/N, L230I, V321I) identificadas recientemente por conferir resistencia a una nueva generación de inhibidores de la polimerasa análogos de nucleósido como PSI-352938 (Lam et al., 2011). Únicamente se consideraron aquellas mutaciones cuya prevalencia fue >1%.

### **3.3 Resultados**

Se analizaron un total de 5790 secuencias: 1612 secuencias de la región de la proteasa NS3, 1025 secuencias de la polimerasa NS5B y 3153 secuencias de la proteína NS5A.

### **3.3.1 Polimorfismos naturales en la proteasa NS3 del VHC**

Se obtuvieron y analizaron 1612 secuencias de la región de la proteasa NS3 del VHC. La distribución por genotipos se recoge en la **figura 9**.



**Figura 9.** Distribución por genotipos de las secuencias de la proteasa NS3 del VHC analizadas

Las secuencias de genotipo 1 fueron las mayoritarias (75%), seguidas de las de genotipo 3 (16%), genotipo 2 (7%) y genotipo 4 (2%). La prevalencia de polimorfismos genéticos varía en función del genotipo y del subtipo genético (**tabla 9**). En las secuencias de los subtipos 1a la prevalencia de polimorfismos asociados con resistencia a inhibidores de la proteasa (IP) fueron < 5%, a excepción del polimorfismo Q80K, asociado con resistencia a simeprevir, presente en casi el 40% de las secuencias. En el genotipo 1b, se observaron cambios en la posición 122 asociados con resistencia a telaprevir en un 8,6% de las secuencias y en los genotipos 2 en un 79%. En las secuencias de genotipo 4 únicamente se observó la presencia del polimorfismo T54S en un 5.5% de las secuencias.

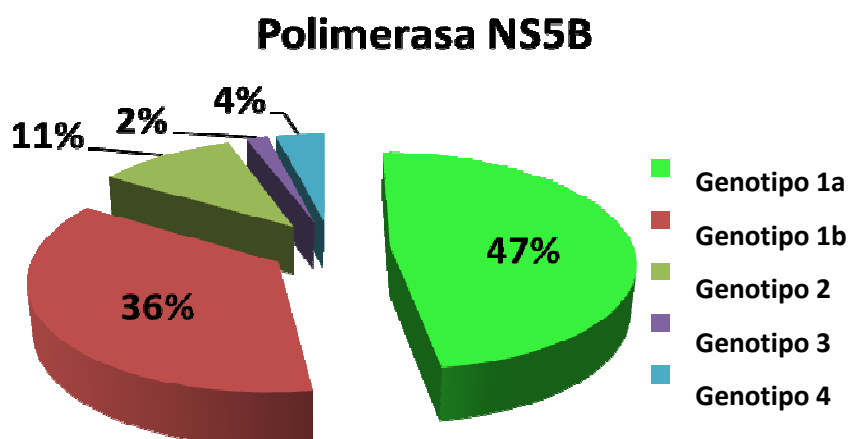
Otro hallazgo relevante, junto al del polimorfismo Q80K en un 40% de los subtipos 1a, es la presencia de la mutación D168Q, también asociada con resistencia a simeprevir, casi la totalidad de los genotipos 3 (99,2%).

Mutaciones asociada a resistencia a los AAD	1a	1b	2	3	4	AAD afectados por polimorfismos específicos
T54A/S	1,4% S	>1% S	0	0	5,5% S	Telaprevir, Boceprevir
V55A	1,2% A	0	0	0	0	Boceprevir
Q80K	39,7% K	>1% K	>1%K	0	0	Simeprevir
S122A/G/R	4,5% G	8,6% G	79% R	0	0	Telaprevir
D168A/H/T/V/Q	0	0	0	99,2% Q	0	Simeprevir

**Tabla 9.** Prevalencia de polimorfismos naturales asociados con resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3 del VHC por genotipo.

### 3.3.2 Polimorfismos naturales en la polimerasa NS5B del VHC

De las 1025 secuencias obtenidas de la región la polimerasa NS5B, 860 pertenecían a pacientes de genotipo 1 (figura 10).



**Figura 10.** Distribución por genotipos de las secuencias de la polimerasa NS5B del VHC analizadas.

Con respecto a los análogos de nucleósido, ninguna de las secuencias analizadas presentó polimorfismos genéticos asociados con resistencia a esta familia. Por el contrario, los polimorfismos asociados a resistencia a los no-análogos de nucleósido fueron muy comunes (**Tabla 10**).

En las secuencias de los genotipo 1 cabe destacar la presencia de polimorfismos en determinadas posiciones con altas prevalencias, tanto en los subtipos 1a (por ej. polimorfismo V499A (96,2%)) como en los subtipos 1b con la presencia de las mutaciones C316N (36%) y S556G (89%). Se encontraron también cambios en las posiciones 421 y 423 aunque en menor prevalencia (3%-13%).

Las secuencias de los genotipos 2, 3 y 4 presentaron entre 3 y 5 posiciones con polimorfismos asociados con resistencia (421, 445, 482, 499 y 556) con prevalencias que oscilaban entre el 87%-100%. Además, también se observaron otros polimorfismos asociados con resistencia aunque con menor frecuencia:: L419V en el 2,7% de las secuencias de genotipo 2, V494A en el 5,2% de los genotipos 3 y por último M414L y C316N presentes en el 34,2% y 8%, respectivamente, de las secuencias de genotipo 4.

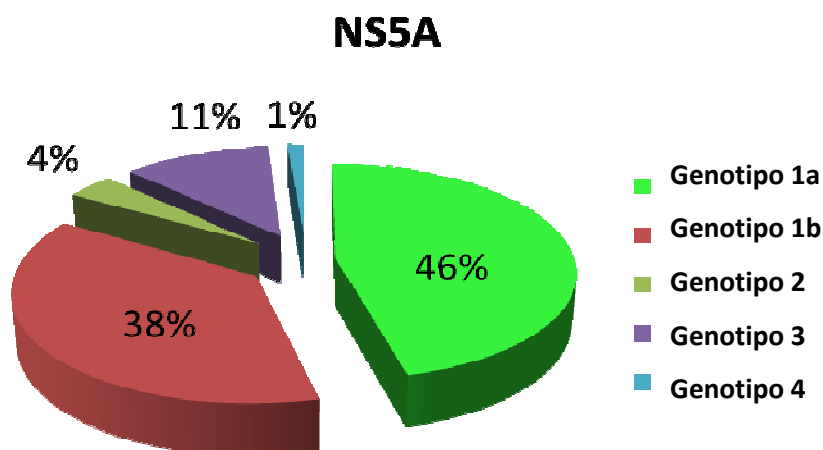
Mutaciones asociadas a resistencia a los AAD	1a	1b	2	3	4	AAD afectados por polimorfismos específicos
C316Y/N	0	36% N	0	0	8% N	ABT-333 (NNI-3) ABT-072 (NNI-3) Tegobuvir (NNI-5)
M414T/L	0	0	0	0	34,2% L	Setrobuvir (NNI-3) ABT-333 (NNI-3) ABT-072 (NNI-3)
L419M/V	0	0	2,7% V	0	0	Filibuvir (NNI-2)
A421V	12,5% V	3,7% V	88% V	0	87% V	BMS-791325(NNI-1)
M423T/I/V	1,8% I	0	0	0	0	Filibuvir (NNI-2)
C445F	0	>1% F	99,1% F			Tegobuvir (NNI-5)
I482L/V/T	>1% L	>1% L	100% L	100% L	100% L	VX-222 (NNI-2)
V494I/A	0	>1% I	100% A	5,2% A	0	BI-7127 (NNI-1)
V499A	96,2% A	10,5%A	91% A	100% A	100%A	BI-7127 (NNI-1)
S556G	>1% G	89% G	99,1% G	100% G	97,4% G	Setrobuvir (NNI-3) ABT-333 (NNI-3) ABT-072 (NNI-3)

AAD: Agentes Antivirales de Acción Directa; NNI-1: (*non-nucleoside inhibitors*) Inhibidor no análogo de nucleot(s)ido del sitio 1; NNI-2: (*non-nucleoside inhibitors*) Inhibidor no análogo de nucleot(s)ido del sitio 2; NNI-3: (*non-nucleoside inhibitors*) Inhibidor no análogo de nucleot(s)ido del sitio 3; NNI-5: (*non-nucleoside inhibitors*) Inhibidor no análogo de nucleot(s)ido del sitio 5.

**Tabla 10.** Prevalencia de polimorfismos naturales asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B del VHC por genotipo.

### 3.3.3 Polimorfismos naturales en la proteína NS5A

Se obtuvieron 3153 secuencias de la región NS5A en las que el genotipo 1 fue el mayoritario (**figura 11**).



**Figura 11.** Distribución por genotipos de las secuencias de la proteína NS5A del VHC analizadas.

Hay que destacar una ausencia casi total de polimorfismos asociados con resistencias a los inhibidores de NS5A en las secuencias de genotipos 1 y 3, a excepción de las mutación Y93H presente en un 2%, en los genotipo 1b (**Tabla 11**). Por el contrario en las secuencias de genotipo 4 la presencia de polimorfismos asociados con resistencia a inhibidores de NS5A fue más común que en el resto de genotipos, presentando la mitad de ellas (51,3%) el polimorfismo Q30R, y un 8% el cambio Q30S. El cambio L31M se observó en un 92% de las secuencias.



Mutaciones asociada a resistencia a los AAD	1a	1b	2	3	4	AAD afectados por polimorfismos específicos
Q30H/R/S	>1% R	0	>1% K	0	51,3% R 8,1% S	Daclatasvir GS-5885 ABT-267
L31M/V/F	0	0	83,5 % M	>1% M/V	92% M	Daclatasvir GS-5885 ABT-267
Y93C/H/N	>1% C	2% H	0	0	5,4% H	Daclatasvir GS-5885 ABT-267

**Tabla 11.** Prevalencia de polimorfismos naturales asociados con resistencia a los inhibidores de la proteína NS5A del VHC por genotipo.

### **3.4 Discusión.**

Aunque la mayoría de los AAD han demostrado una extraordinaria potencia antiviral, la rápida emergencia de mutaciones de resistencias en ausencia de una supresión viral completa, debe ser considerada como una amenaza para el éxito de estas nuevas terapias. Por otro lado, la gran variabilidad genética del VHC puede favorecer la presencia de polimorfismos naturales asociados con resistencia a los AAD que de forma basal podrían comprometer la eficacia antiviral de algunos de estos fármacos.

En la infección por VIH, teniendo en cuenta las tasas de prevalencia de mutaciones primarias a los antirretrovirales en las nuevas infecciones (~8.6%) ([Mongue et al., 2012](#), [De Mendoza et al., 2008](#)) se recomienda la realización de un estudio de resistencias antes del comienzo de la terapia antirretroviral. Los resultados del mismo permiten seleccionar el tratamiento antirretroviral más óptimo que asegure el éxito terapéutico.

En el caso de la infección por VHC, en relación a los AAD, se desconoce todavía el papel que podrían tener los estudios de resistencias antes de iniciar un tratamiento con estos fármacos. Para ello, es importante conocer cuál es la prevalencia de mutaciones asociadas con resistencias a los AAD en pacientes con infección por VHC.

El presente estudio ha evaluado la presencia de polimorfismos naturales en 1612 secuencias de la proteasa NS3, 1025 secuencias de la polimerasa NS5B y 3153 de la región NS5A obtenidas de la base de datos de Los Álamos. Para el análisis únicamente se han tenido en cuenta aquellos polimorfismos presentes con prevalencias > al 1%. Los datos reflejan que los polimorfismos basales son comunes en las tres regiones y son dependientes del genotipo y del subtipo viral. En la región de la proteasa NS3, la prevalencia de las mutaciones en las posiciones 36, 155, 156, que tienen un mayor impacto en la resistencia a los IP es < 1%. Sin embargo, hay que destacar la elevada prevalencia de los polimorfismos Q80K en los subtipos 1a (40%) y D168Q en los genotipos 3 (~100%). El polimorfismo Q80K se asocia con una reducción de la sensibilidad a simeprevir. Estudios *in vitro* han observado que aquellas variantes de VHC portadoras del polimorfismo Q80K, presentan una reducción en la susceptibilidad de hasta 10 veces ([Fried et al., 2011](#)). El impacto de la presencia de este polimorfismo en la respuesta virológica a simeprevir ha sido evaluado recientemente en la fase II del ensayo clínico ASPIRE. La tasa de respuesta virológica sostenida a simeprevir a dosis de 100 mg fue significativamente menor en los genotipos 1a portadores de forma basal de la mutación Q80K, en comparación con los que no la tenían (22% vs. 70%, respectivamente). Estas diferencias en cuanto a RVS se solventaban cuando se aumentaban las dosis de simeprevir a 150 mg ([Lenz et al., 2012](#)). El polimorfismo

D168Q, presente en todas las secuencias de genotipo 3, parece explicar la resistencia natural a simeprevir en estas variantes ([Lenz et al., 2011](#)).

El impacto de la presencia de polimorfismos basales a IP's fue evaluada en un subanálisis del ensayo clínico RESPOND-2, en el que se evaluó la respuesta a la terapia triple con boceprevir + IFNpeg/RBV en pacientes que previamente no habían respondido a un tratamiento con IFNpeg/RBV. Se observó que aquellos pacientes que presentaban polimorfismos basales asociados con resistencia al inhibidor de la proteasa, respondían peor que aquellos que no presentaban mutaciones basales (23% vs. 34%, respectivamente). Más concretamente, la presencia de alguna de estas mutaciones T54S/A, V55A, V36M o R155K se asociaba con una falta de respuesta a la triple terapia ([De Meyer et al., 2012](#)). En nuestro estudio los pacientes infectados por genotipo 1b no presentaban polimorfismos basales en ninguna de estas posiciones mientras que los 1a presentaron prevalencias de 1,4% y 1,2% en las posiciones 54 y 55 respectivamente. Esto sumado a la mayor facilidad de los genotipos 1a para seleccionar mutaciones como V36M y R155K ([Sarrazin et al. 2010](#)), asociadas con un alto grado de resistencia, podría explicar en cierta medida que los pacientes 1a respondan, en general, peor a la terapia con boceprevir y telaprevir que los 1b.

Con respecto a los polimorfismos asociados a resistencia con los inhibidores de la polimerasa hay que destacar la ausencia de los mismos en posiciones asociadas con resistencias a los análogos de nucleósido. Este hecho refuerza la alta barrera genética que tiene esta familia de inhibidores para el desarrollo de resistencias. Por el contrario es muy común encontrar polimorfismos en posiciones asociadas con resistencia a los no-análogos de nucleósido ([Le Pogam et al., 2008](#)). En los distintos genotipos

examinados (1-4), se encontró una mayor prevalencia de polimorfismos en secuencias de pacientes de genotipo 2, afectando a los 5 posibles sitios de unión a la polimerasa.

Nuestros resultados concuerdan con estudios *in vitro* donde se ha evaluado la eficacia de varios inhibidores de análogos y no análogos de distintos genotipos ([Herlihy et al., 2008](#)). El efecto significativo de la mutación I482L sobre los inhibidores del sitio-2 de la polimerasa se demostró en el modelo de replicón. La presencia de una sola mutación disminuye la actividad inhibitoria del orden de 150 veces. El 100% de los pacientes de genotipo 2, 3 y 4 presentaban esta mutación en nuestro estudio. Esto podría explicar que los compuestos derivados de los benzimidazoles sean menos efectivos en los pacientes de genotipo 2, 3 y 4.

En este trabajo además, se ha evaluado la prevalencia de los diferentes polimorfismos en función del subtipo genético 1a vs. 1b. La decisión de separar los resultados en función del subtipo viral está basada en la diferente respuesta virológica recientemente observada entre ambos subtipos durante los ensayos clínicos con los AAD de forma que los pacientes con genotipo 1a responden en general peor a los distintos AAD que los pacientes con subtipo 1b. Actualmente se desconocen los mecanismos moleculares por los que existen estas diferencias a nivel de subtipos. Otro ejemplo de la variabilidad a nivel de subtipos en los genotipos 1 es el caso del polimorfismo C316N, asociado con resistencia a los inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido, presente en un 36% en los subtipos 1b mientras que en los subtipos 1a se encontró en una proporción inferior al 1% de las secuencias, de forma similar a lo observado en otros estudios ([Di Maio et al., 2012](#)). Existen, otros polimorfismos como el V499A que, aunque se relacionan con un bajo nivel de

resistencia a los inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido, está presente en >90% de todos los genotipos excepto en el genotipo 1b en los que presenta una prevalencia del 10%, similar a lo observado por [Legrand-Abravanel et al., 2009](#). De igual modo, en este estudio también se observó una prevalencia del polimorfismo S556G en más del 90% de los pacientes infectados con genotipos 1b, 2, 3 y 4 al igual que en nuestro estudio.

Por último se examinaron aquellos polimorfismos en la región NS5A asociados con resistencia a los inhibidores de la proteína NS5A. Hasta el momento el inhibidor de la NS5A en fases más avanzadas de desarrollo es Daclatasvir de manera que las posiciones que se han examinado han sido aquellas asociadas hasta el momento con resistencia a dicho inhibidor ([Gao et al., 2010](#), [Fridell et al 2010](#), [Wang et al., 2012](#)).

En general, es poco frecuente encontrar polimorfismos que afecten a la susceptibilidad del inhibidor en genotipos 1a, 1b y 3 mientras que son más comunes en genotipos 2 y 4.

Son de especial interés los cambios observados en el codón 30 (50% Q30R, y 8% Q30S) en los genotipos 4 asociados a un alto grado de resistencia ([Wang et al., 2012](#)) así como el polimorfismo Y93H presente en un 5% y 2% de los genotipos 4 y 1b, respectivamente. Estos resultados son similares a los publicados recientemente por [Suzuki et al., 2012](#). La presencia de estos polimorfismos de forma basal podrían afectar a la respuesta virológica en aquellos pacientes portadores de estas variantes o facilitar la selección de otras mutaciones asociadas con resistencia por lo que se recomienda el uso concomitante con otros AAD ([Wang et al., 2012](#)).

---

En resumen, la presencia de polimorfismos basales asociados con resistencia a los AAD en secuencias de proteasa, polimerasa y proteína NS5A del VHC en pacientes naïve a tratamiento con AAD es dependiente del genotipo y del subtipo viral.

---

Los resultados de este estudio fueron presentados con una comunicación oral en el “10<sup>th</sup> European Workshop on HIV & Hepatitis Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance” que tuvo lugar en Barcelona, España en marzo de 2012 (Anexo II).

**Referencia:** Zulema Plaza, Vicente Soriano, Pablo Barreiro, Eva Poveda. **“Effect of natural variability at the HCV NS3 protease, NS5B polymerase and NS5A genes on response to direct acting antivirals agents (DAA)”**. Reviews in Antiviral Therapy & Infectious Diseases. Vol.2: 2012. Abstract O-12.p:14



## **ESTUDIO 2:**

---

**Prevalencia de polimorfismos naturales asociados con resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3 frente al VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC.**





#### **4.1 Objetivo y diseño del estudio**

El objetivo del estudio fue evaluar la prevalencia de los polimorfismos naturales asociados con resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3 frente al VHC. Se evaluó en pacientes coinfectados VIH/VHC analizando las posibles diferencias en la prevalencia de estas mutaciones entre los pacientes infectados con subtipo 1a y 1b del VHC

Para ello se amplificó la proteasa del VHC a partir de muestras de pacientes VIH+ recientemente diagnosticados en distintos hospitales de Madrid entre enero de 2000 y febrero de 2010 y que estaban coinfectados con el genotipo 1 del VHC. A partir de las secuencias de NS3 obtenidas se analizó la presencia de polimorfismos asociados con resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3 del VHC.

#### **4.2 Pacientes y métodos**

##### **4.2.1 Población de estudio**

Se identificaron aquellos pacientes VIH recientemente diagnosticados en distintos hospitales de Madrid entre Enero de 2000 y Febrero de 2010 que fueron testados para VHC mediante un ensayo enzimático.

##### **4.2.2 Determinación carga viral y genotipo de VHC.**

En las muestras positivas para VHC se cuantificó la carga viral del VHC utilizando el ensayo cuantitativo de PCR a tiempo real de Abbott (Abbott Laboratories, Madrid, España) o el ensayo Versant 3.0 b DNA (Siemens, Barcelona, España). En pacientes

virémicos, el genotipo de VHC se determinó utilizando la versión 2.0 del LiPA (Innogenetics, Ghent, Bélgica).

Para el análisis de las secuencias sólo se seleccionaron aquellos pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC.

#### **4.2.3 Amplificación de la región NS3**

La amplificación de la región NS3 se hizo con cebadores y condiciones específicas de cada subtipo viral (1a y 1b). La amplificación de la proteasa se realizó en dos partes (entre 1200-1500 pb cada una) para aumentar el éxito de amplificación. Las condiciones para la amplificación de la secuencia y los cebadores fueron los siguientes:

PCR	Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Sentido
1 <sup>a</sup>	PR1aEF1	CGAGATCTGGCCGTGGCTG	Forward
	PR1aER1	GACTGTCTGGGTGACACACG	Reverse
	PR1aEF2	TGACATAATAATTTGTGACG	Forward
	PR1aER2	GTGACGGCAGCTGTAAAAGC	Reverse
2 <sup>a</sup>	PR1aIF1	GTGCGGTGACATCATCAACG	Forward
	PR1aIR1	CGAGCTCGTCGCACTTCTTC	Reverse
	PR1aIF2	TTGACCAAGCAGAGACTGCG	Forward
	PR1aIR2	GTCTGCAGGAGGCCGAGGGC	Reverse
1 <sup>a</sup>	PR1bEF1	GGGCTCATYCGTGCATGCATG	Forward
	PR1bER1	CGTCGTCTCAATGGTGAAGG	Reverse
	PR1bEF2	CCCTTCTATGGCAAAGCCAT	Forward
	PR1bER2	TTCCACATGTGCTTCGCCC	Reverse
2 <sup>a</sup>	PR1bIF1	GAGACCAAGRTCATCACCTGG	Forward
	PR1bIR1	CGACTGTCTGGGTGACACATG	Reverse
	PR1bIF2	CTYGATGTGTCCGTCATACC	Forward
	PR1bIR2	GCCTCCGCTTGCTTGGTGGC	Reverse

### **Condiciones para Genotipo 1a**

RT-PCR

Perfil térmico		40 ciclos
Temperatura	Tiempo	
50º	30 min	
94º	15 min	
94º	35 seg	
53º	35 seg	
72º	1min 30 seg	
72º	10min	
4º	∞	

Nested PCR

Perfil térmico		40 ciclos
Temperatura	Tiempo	
94º	3 min	
94º	35 seg	
53º	35 seg	
72º	1min 30 seg	
72º	10min	
4º	∞	

### **Condiciones para Genotipo 1b**

RT-PCR

Perfil térmico		40 ciclos
Temperatura	Tiempo	
50º	30 min	
94º	15 min	
94º	35 seg	
55º	35 seg	
72º	1min 30 seg	
72º	10min	
4º	∞	

Nested PCR

Perfil térmico		40 ciclos
Temperatura	Tiempo	
94º	3 min	
94º	35 seg	
55º	35 seg	
72º	1min 30 seg	
72º	10min	
4º	∞	

#### **4.2.4 Análisis de las secuencias**

Se utilizó la secuencia H77 de genotipo 1a como modelo de referencia tal y como ha sido recomendado recientemente por el Grupo Asesor de fármacos en desarrollo para el VHC (HCV DrAG) ([Kwong et al., 2011](#)). Las mutaciones fueron examinadas manualmente y sólo se tuvieron en cuenta aquellos cambios cuya prevalencia fuera >1%. La interpretación de las mutaciones de resistencias para los diferentes fármacos se realizó teniendo en cuenta el documento del Grupo Asesor para el desarrollo frente

a fármacos del VHC y el grupo de estudio de fenotipo VHC, 2012. Las posiciones examinadas fueron las descritas por [Sarrazin et al. 2010](#).

### **4.3 Resultados**

#### **4.3.1 Características basales de los pacientes del estudio**

Se identificaron un total de 1684 nuevos diagnósticos de VIH durante los 10 años del periodo de estudio. De éstos, 141 (8,4%) fueron VHC+, siendo la media de carga viral de 5,6 log UI/ml en los pacientes virémicos. Aproximadamente el 20% de los pacientes VHC+ fueron avirémicos, lo que es indicativo de un aclaramiento espontáneo de la infección. Las características demográficas de los pacientes virémicos están recogidas en la **tabla 12**.

<b>Parámetros</b>	<b>Valores</b>
Género masculino, %	74
Ruta de transmisión	
UDVP,%	46
Homosexual,%	27
Heterosexual,%	22
Desconocido,%	5
Nacionalidad	
Española	63
Latino-Americana	13
África sub-sahariana	13
Europeos	9
Otros	2
ARV naïve, %	100
Media CD4	387 [182-689]
Carga viral VIH, log UI/ml	4,6
Genotipos	
1, n (%)	67(58)
2, n (%)	3(2)
3, n (%)	22(19)
4, n (%)	24(21)

**Tabla 12.** Características demográficas de los pacientes virémicos

De los 67 pacientes genotipo 1 del VHC, el 64% (n=43) eran genotipo 1a, 30% (n=20) genotipo 1b y el 6% (n=4) no se pudo subtipar. En su mayoría fueron hombres españoles y usuarios de drogas por vía parenteral.

#### **4.3.2. Cambios asociados con resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3**

Se pudieron obtener 55 secuencias completas de pacientes con genotipo 1 (39 de genotipo 1a y 16 de genotipo 1b). El resto de las muestras no se pudieron amplificar debido fundamentalmente a los bajos niveles de carga viral de VHC que tenían. La **tabla 13** recoge los resultados obtenidos en el estudio.

<b>Subtipo VHC</b>	<b>1a</b>	<b>1b</b>
<b>Número de pacientes</b>	39	16
<b>V36A/M/L/G, %</b>	0	0
<b>T54S/A,%</b>	0	0
<b>V55A, %</b>	5,1	0
<b>Q80R/K,%</b>	20	<1
<b>R155K/T/M/G/L/S, %</b>	0	0
<b>A156S/T/V/L, %</b>	0	0
<b>D168A/V/E, %</b>	0	0
<b>V170A, %</b>	0	0

**Tabla 13.** Prevalencia de polimorfismos asociados con resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3 del VHC.

En este estudio sólo se encontraron cambios con una prevalencia superior al 1% en las posiciones 55 y 80. La mutación V55A sólo estuvo presente en los subtipos 1a con una prevalencia del 5,1%. El polimorfismo Q80K estuvo presente en ambos subtipos aunque su prevalencia fue significativamente más alta en los pacientes con genotipo 1a frente a los 1b (20% en subtipos 1a vs. <1% en subtipos 1b).

#### **4.4 Discusión**

Este es uno de los primeros estudios que proporciona información sobre la prevalencia de polimorfismos asociados con resistencias a los inhibidores de la proteasa del VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC. De una población inicial de 1684 nuevos diagnosticados por VIH en los últimos 10 años en dos clínicas de Madrid, la seroprevalencia del VHC fue del 8,4%. Aproximadamente el 20% de ellos eran pacientes con carga viral del VHC indetectable, lo que refleja un aclaramiento espontáneo de esta infección. Este porcentaje es similar al observado en otros estudios con pacientes VIH+ ([Soriano et al., 2008b](#)).

En este estudio se han caracterizado los cambios amino acídicos en posiciones asociadas con resistencia a los inhibidores de la proteasa (NS3). Finalmente, se pudieron analizar un total de 55 secuencias de proteasa de VHC genotipo 1. En nuestro estudio sólo se observaron polimorfismos asociados con resistencia a inhibidores de la proteasa del VHC con prevalencias >1% en las posiciones 55 y 80. El polimorfismo Q80K, se encontró con una prevalencia del 20% en pacientes con genotipo 1a frente a <1% en los 1b. Este polimorfismo se ha asociado recientemente con una reducción de la susceptibilidad a faldaprevir y simeprevir de 2-10 veces ([Lagacé et al., 2012](#), [Lenz et al. 2010](#), [Fried et al., 2011](#)). Es interesante el hecho de que a pesar de la diferente

composición nucleotídica del codón 80 entre los subtipos 1a y 1b, la barrera genética para seleccionar resistencia en ambos subtipos es la misma (una transversión lleva a la mutación Q80K) ([Cento et al., 2012](#)). Además, el cambio en la posición 55, presente en un 5,1% de los pacientes, se ha asociado recientemente con una falta de respuesta a boceprevir y telaprevir en pacientes no respondedores a la terapia previa con IFNpeg/RBV ([Susser et al. 2009](#), [De Meyer et al., 2012](#)). Por otro lado hay que destacar que la prevalencia de la mutación R155K que confieren un alto nivel de resistencia (10-100 veces) a los inhibidores de primera y segunda generación ([Sarrazin et al., 2010](#)) fue < 1%. Esta mutación se selecciona más frecuentemente en los pacientes de genotipo 1a que en los 1b y se estima que tiene una vida media de 1-2 años ([Strahotin et al., 2012](#); [Sullivan et al., 2013](#)).

Estos datos son similares a los obtenidos en el estudio 1 donde se evaluó la prevalencia de polimorfismos asociados con resistencias a los inhibidores de la proteasa en secuencias obtenidas de la base de datos de “Los Álamos” en su mayoría pertenecientes a pacientes monoinfectados VHC. Además los resultados obtenidos coinciden con los publicados recientemente por [Alves et al., 2013](#). En cuanto a la mutación V55A la prevalencia encontrada en este estudio (5,1%) fue más alta que la observada a partir de las secuencias obtenidas de la base de datos de “Los Álamos” en el estudio 1 (1,2%). Por el contrario, la prevalencia del polimorfismo Q80K fue menor en este estudio que la observada en el estudio 1. Estas pequeñas diferencias en cuanto a la prevalencia de estos polimorfismos podría deberse al pequeño tamaño muestral del presente estudio.



En el ensayo clínico RESPOND-2 ([De Meyer et al., 2012](#)) se evaluó el impacto de la presencia de estos polimorfismos de forma basal sobre la respuesta a boceprevir en pacientes de genotipo 1 previamente no respondedores a la terapia con IFNpeg $\alpha$ /RBV. Se pudo observar que la presencia de una sola mutación de forma basal (T54S/A, V55A, V36M o R155K) se asociaba con una falta de respuesta a la triple terapia (BOC +IFNpeg/RBV). Estos resultados afectarían a aquellos pacientes infectados con genotipo 1a de nuestro estudio que presentan el polimorfismo V55A de manera basal, en los que habría que evaluar qué impacto tiene la presencia de esta mutación aislada en la respuesta a boceprevir.

Además se ha descrito que la presencia del polimorfismo Q80K en pacientes con genotipo 1a disminuye la respuesta a simeprevir a dosis de 100mg ([Fried et al., 2011](#); [Lenz et al., 2012](#)).

En general, salvo en el caso de la mutación V55A, no se ha encontrado ninguna evidencia de una mayor prevalencia de resistencias primarias a inhibidores de la proteasa en pacientes coinfectados VIH/VHC, tomando como referencia datos obtenidos de pacientes mayoritariamente monoinfectados con VHC del estudio 1. En los pacientes con genotipo 1a del VHC, la alta prevalencia del polimorfismo Q80K, y a la presencia de la mutación V55A en algunos pacientes, sería recomendable la realización de un estudio de resistencia basal antes de iniciar un tratamiento con inhibidores de la proteasa.

Parte de los resultados obtenidos en este estudio fueron publicados en “*Antiviral Therapy*” en 2011 (Anexo II).

**Referencia:** Ana Treviño, Carmen de Mendoza, Patricia Parra, Carmen Rodríguez, Antonio Madejón, Zulema Plaza, Jorge del Romero, Eva Poveda, Vicente Soriano. Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against HCV in newly diagnosed HIV-HCV-coinfected patients. *Antiviral Therapy*. 2011; 16(3):413-6.



## **ESTUDIO 3:**

---

**Prevalencia de polimorfismos naturales asociados con resistencias a los inhibidores de la polimerasa NS5B frente al VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC.**



## **5.1 Objetivo y diseño del estudio**

El objetivo del estudio fue evaluar la prevalencia de los polimorfismos naturales asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa del VHC, y valorar el impacto de la terapia antirretroviral frente al VIH en la variabilidad genética de la polimerasa del VHC en pacientes VIH/VHC coinfectados.

Para ello se seleccionaron y amplificaron muestras de pacientes naïve a tratamiento frente al VHC y se analizaron los polimorfismos asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa frente al VHC. Además, se compararon estas secuencias basales con las secuencias obtenidas de muestras de los mismos pacientes tras dos años de tratamiento antirretroviral estable frente a la infección por VIH. Con este diseño el objetivo era evaluar el impacto de la terapia antirretroviral del VIH sobre la variabilidad genética de la polimerasa del VHC.

## **5.2 Pacientes y métodos**

### **5.2.1 Población de estudio**

Se seleccionaron pacientes VIH/VHC coinfectados en seguimiento en el Hospital Universitario de Valme de Sevilla y en el Hospital Carlos III de Madrid. Se identificaron todos los individuos con terapia antirretroviral estable frente al VIH durante al menos 2 años y que fueran naïve para el tratamiento de la infección por VHC. Se incluyeron en el estudio sólo los individuos que tuvieran muestras tanto al comienzo del tratamiento (basal) como 2 años después.

Se recogió información demográfica, carga viral de ambos virus y tiempo global de exposición a los ARV, así como los ARV que había recibido cada paciente.

### 5.2.2 Amplificación de la región NS5B

Las condiciones y secuencias de los cebadores de genotipo 1 son los mismos descritos en el estudio 2. Para los genotipos 3 y 4 las condiciones para la amplificación de la secuencia (aprox. 1500 nucleótidos) y los cebadores fueron los siguientes:

Genotipo/Subtipo viral	Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Sentido
3	POLEF3	ATTCAACGTCGTCTAGAAGCGC	Forward
	POLER3	AAGATGCCTACCCCTAC	Reverse
	POLIF3	GGAGGTRAAGGAGCGAGCG	Forward
	POLIR3	CCCGCYATTTGCTGCTTTGC	Reverse
4	POLEF4	GGATCRGAGGAYGTMGTRTG	Forward
	POLER4	TGTGATAAATGTCYCCCCCG	Reverse
	POLIF4	CTGCCMATYARCCCCCTGAG	Forward
	POLIR4	GGCAATGGAGTGAGTYTG	Reverse

#### **Condiciones Genotipo 3**

RT-PCR

Perfil térmico		40 ciclos
Temperatura	Tiempo	
50º	30 min	
94º	15 min	
94º	35 seg	
53º	35 seg	
72º	1min 45 seg	
72º	10min	
4º	∞	

Nested PCR

Perfil térmico		40 ciclos
Temperatura	Tiempo	
94º	3 min	
94º	35 seg	
53º	35 seg	
72º	1min 45 seg	
72º	10min	
4º	∞	

#### **Condiciones Genotipo 4**

RT-PCR

Perfil térmico	
Temperatura	Tiempo
50º	30 min
94º	15 min
94º	35 seg
55º	35 seg
72º	1min 45 seg
72º	10min
4º	∞

40 ciclos

Nested PCR

Perfil térmico	
Temperatura	Tiempo
94º	3 min
94º	35 seg
55º	35 seg
72º	1min 45 seg
72º	10min
4º	∞

40 ciclos

#### **5.2.3 Análisis de las secuencias**

Se utilizó la secuencia H77 como secuencia de referencia para al análisis de las secuencias de la polimerasa NS5B del VHC genotipo 1 ([Kwong et al., 2011](#)), AB691595 para genotipo 3a y DQ418782 para genotipo 4. Las mutaciones fueron examinadas manualmente y sólo se tuvieron en cuenta para el análisis aquellas mutaciones cuya prevalencia fuera >1%. Las posiciones examinadas fueron las descritas por [Sarrazin et al. 2010](#) y las mutaciones S15G, S96T, R222Q, C223Y/N, L230I, V321I asociadas recientemente con resistencia a PSI-352938 ([Lam et al., 2011](#)).

### **5.3 Resultados**

#### **5.3.1 Características basales de los pacientes del estudio**

Un total de 61 pacientes VIH/VHC coinfectados cumplieron los criterios de inclusión y tenían muestras de sangre disponibles para realizar los estudios correspondientes. Las principales características de los pacientes están resumidas en la **tabla 14**.



Variables	Valores
Género masculino, n (%)	37 (61%)
Mediana de edad, años [IQR]	48 [45-50]
Mediana de tiempo en tratamiento ARV, meses [IQR]	45 [28-83]
ITIANs, n	
Tenofovir	12
Abacavir	12
Emtricitabina	12
Lamivudina	23
Zidovudina	13
Didanosina	12
Estavudina	5
Mediana de VIH-ARN basal , log copias/ml [IQR]	4,4 [3,6-4,9]
Mediana de VHC-ARN basal ,log UI/ml [IQR]	6,1 [5,5-6,8]
Genotipos VHC	
1a	21
1b	15
3	11
4	14

N: número de pacientes; ARV: antirretroviral; ITIANs: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido; IQR; Rango intercuartílico.

**Tabla 14.** Características basales de los pacientes del estudio.

La mayoría eran hombres con una media de tiempo en tratamiento ARV de 45 meses. Todos iniciaron tratamiento ARV con regímenes que incluyeron dos ITIAN's. La mediana de carga viral basal del VIH en estos pacientes fue de 4 log UI/ml mientras que la de VHC fue de 6 log UI/ml. En su mayoría fueron pacientes infectados con el genotipo 1 del VHC.

### **5.3.2 Cambios asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B no análogos de nucleósido (NNI)**

La prevalencia de cambios asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B no análogos de nucleósido del VHC varió en función de los distintos genotipos/subtipos de VHC. Como se muestra en la **tabla 15**, todos los pacientes infectados con genotipos 1a y 3 del VHC, presentaron la mutación V499A, asociada con

resistencia a los inhibidores no análogos de nucleósido que se unen al sitio 1 de la polimerasa (NNI-1). De la misma manera, todos los genotipos 3 mostraron la I482L, asociada con resistencia a NNI-2. Por último, todos los pacientes con genotipo 4 presentaron los cambios M414L, I482L y V499A, asociados con resistencia a fármacos de la familia de NNI-3, NNI-2 y NNI-1, respectivamente. Sólo dos pacientes con genotipo 1b presentaron la mutación C316N, cambio asociado con resistencia a NNI-3 y 5.

### **5.3.3 Cambios asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B análogos de nucleósido (NI)**

En contraste a lo visto con los inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido donde la prevalencia de polimorfismos asociados a resistencia es muy alta, ninguna de las secuencias de la polimerasa NS5B mostró polimorfismos asociados con resistencias a inhibidores de NS5B análogos de nucleósido.

### **5.3.4 Impacto del tratamiento antirretroviral frente al VIH sobre la variabilidad de la polimerasa NS5B del VHC**

Tras examinar los polimorfismos asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B no análogos de nucleósido en muestras basales (previas al ARV) y dos años después del inicio de la terapia, no se encontraron cambios en las secuencias de la polimerasa NS5B del VHC obtenidas de las muestras del seguimiento con respecto a las muestras basales.

Familia	Fármaco	Codones asociados a resistencia	Genotipos/subtipos VHC			
			1a (n=21)	1b (n=15)	3 (n=11)	4 (n=14)
NNI-1	BI-207127 BMS-1325	P495S/L/A/T	0	0	0	0
		P496A/S	0	0	0	0
		V499A	A 100%	0	A 100%	A 100%
NNI-2	VX-222	L419M/V	0	0	0	0
		M423T/I/V	0	0	0	0
		Y448C/H	0	0	0	0
		I482L/V/T	0	0	L100%	L100%
		V494I/A	0	0	0	0
	Filibuvir	M423T/I/V	0	0	0	0
NNI-3	ABT-072	C316Y/N	0	N13,3%	0	0
	Setrobuvir	S365T/A	0	0	0	0
		M414T/L	0	0	0	L100%
		G554D	0	0	0	0
		D559G	0	0	0	0
NNI-5	Tegobuvir	C316Y/N	0	N13,3%	0	0
		C445F	0	0	F100%	F100%
		Y448C/H	0	0	0	0

NNI, (*non-nucleoside inhibitors*) inhibidores no análogos de nucleósido; A, arginine; N, asparagine; L, leucine.

**Tabla 15.** Prevalencia de cambios asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B no análogos de nucleósido

## **5.4 Discusión**

Este estudio evalúa la influencia de la infección por VIH y del tratamiento antirretroviral sobre la variabilidad genética de la polimerasa NS5B del VHC, centrándose en la selección de mutaciones asociadas con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B en desarrollo para el tratamiento de la infección por VHC. Se reclutaron un total de 61 pacientes coinfectados VIH/VHC sin exposición previa a IFNpeg/RBV y/o a ningún AAD experimental. Todos iniciaron tratamiento ARV con regímenes que incluyeron dos ITIAN. Se examinaron cambios asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B, tanto a inhibidores no análogos de nucleósido como a inhibidores análogos de nucleósido, de forma basal y tras dos años de terapia ARV. De forma basal, no se encontraron mutaciones asociadas con resistencia a los inhibidores análogos de nucleósido. Por el contrario, fueron frecuentes los cambios asociados con resistencia a los inhibidores no análogos de nucleósido en todos los genotipos/subtipos genéticos del VHC. Este fue el caso de la mutación V499A, que produce resistencia a los NN-1 (ej. BMS-1325 y BI7127). De forma comparable, todos los pacientes con genotipo 3 y 4 presentaban las mutaciones C445F, I482L y V499A, asociadas con resistencia a los NNI-2 y NNI-5 (ej. VX-222 y tegobuvir, respectivamente). Únicamente 2/15 pacientes de genotipo 1b presentaron la mutación C316N, asociada con resistencia a NNI-3 y NNI-5 (ej., setrobuvir y tegobuvir, respectivamente). Hay que destacar que la prevalencia de estos polimorfismos fue comparable con aquellos reportados en el estudio 1 que procedían de secuencias obtenidas de la base de datos de Los Álamos, (derivadas principalmente de pacientes monoinfectados). Los resultados obtenidos fueron también similares a los observados

en otros estudios llevados a cabo en pacientes mono infectados ([Legrand-Abravanel et al., 2009](#)).

También hay que señalar que no hubo cambios entre los polimorfismos encontrados de forma basal (antes de comenzar el ARV) y los presentes dos años después de la exposición a ARV. Este hecho sugiere que los ITIAN's e ITINAN's empleados en el tratamiento de la infección por VIH no favorecen la selección de mutaciones que comprometan la actividad de los AAD en los pacientes coinfectados VIH/VHC. En realidad, esta observación es consistente con el hecho de que existen grandes diferencias estructurales entre la transcriptasa inversa del VIH y la polimerasa NS5B del VHC, de manera que cada uno de los compuestos de la combinación se unirán de forma específica a sus respectivos sitios catalíticos (en el caso de los inhibidores análogos de nucleósidos) o alostéricos (en el caso de los inhibidores no análogos de nucleósido) correspondientes sin que exista actividad cruzada entre fármacos.

Las implicaciones terapéuticas de nuestros hallazgos son inmediatas. La alta prevalencia de polimorfismos naturales observados en la polimerasa NS5B del VHC en posiciones que influyen la susceptibilidad a algunos inhibidores no análogos de nucleósido debería de tenerse en cuenta en aquellos genotipos/subtipos que las portan. Sin embargo, el impacto de cada uno de estos polimorfismos en la pérdida de susceptibilidad a estos fármacos no es la misma. Mientras que los cambios I482L, M414L y C316N confieren un nivel de resistencia de intermedio a alto a NNI-2, NNI-3 y NNI-5, respectivamente, la mutación V499A se asocia a una pequeña reducción en la actividad de los NNI-1 ([Legrand-Abravanel et al., 2009](#); [Kukolj et al., 2005](#)). Teniendo en cuenta esta información, por el momento, no parece estar justificado realizar

resistencias basales a todos los pacientes VHC. Los datos de este estudio indican que todos los individuos deberían ser susceptibles a los inhibidores de la polimerasa NS5B análogos de nucleósidos; como prácticamente todos los pacientes infectados por los genotipos 1b lo serían a los inhibidores no análogos de nucleósido. Por el contrario, los pacientes infectados con los genotipos 1a, 3 y 4 van a presentar de forma basal una susceptibilidad natural reducida a los distintos inhibidores no análogos de nucleósido. Otra consecuencia de nuestros hallazgos pone de manifiesto la importancia del empleo de herramientas diagnósticas que permitan un correcto genotipado pero también subtipado del VHC. Las diferencias en cuanto a la susceptibilidad a los AAD entre los subtipos 1a y 1b del VHC ya han sido demostradas recientemente y se aplican claramente a la susceptibilidad de los inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósido.

Nuestro estudio tiene algunas limitaciones. Primero, no todos los pacientes recibieron la misma combinación de ITIAN's, por lo que no se podría descartar que otros ARV como la estavudina, la cual sólo la habían recibido 5 de los pacientes incluidos en el estudio pudiera tener algún impacto sobre la variabilidad genética de la polimerasa NS5B del VHC. Sin embargo, el resto de ARV están bien representados en nuestra población de estudio por lo que podríamos descartar que tuvieran algún impacto sobre la variabilidad genética del VHC. Otra limitación del estudio podría ser el uso de secuenciación poblacional para examinar la prevalencia de las mutaciones de resistencias. A este respecto, podrían haberse escapado a la determinación variantes virales con cambios asociados a resistencia. Para detectar estas variantes minoritarias sería necesario el uso de herramientas más sensibles como la PCR alelo específica o la

secuenciación masiva. Sin embargo, en este momento no está del todo claro si la presencia de variantes minoritarias portadoras de mutaciones de resistencias podría tener alguna relevancia clínica o terapéutica.

En resumen, el uso de ARV para el tratamiento de la infección por VIH, no tiene impacto en la variabilidad genética de la polimerasa NS5B del VHC ni en la prevalencia de mutaciones de resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B en pacientes coinfectados VIH/VHC. Sin embargo, la presencia de polimorfismos naturales con susceptibilidad reducida a algunos inhibidores de la polimerasa NS5B no análogos de nucleósido es común en los genotipos 1a, 3 y 4 del VHC y debería de ser considerada antes de la utilización de alguno de estos fármacos, al menos en estos genotipos.

---

Los resultados obtenidos en este estudio han sido publicados en *“Journal of Antimicrobial Chemotherapy”* en Septiembre de 2011 (Anexo II).

**Referencia:** Zulema Plaza, Vicente Soriano, María del Mar González, Federico A. Di Lello, Juan Macías Pablo Labarga, Juan Antonio Pineda and Eva Poveda. **Impact of antiretroviral therapy on the variability of the HCV NS5B polymerase in HIV/HCV co-infected patients.** .Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2011 Dec; 66(12):2838-42.

## **ESTUDIO 4:**

---

**Prevalencia de polimorfismos naturales asociados con resistencias a los inhibidores de la proteína NS5A frente al VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC.**





## **6.1 Objetivo y diseño del estudio**

Los objetivos del estudio fueron por una parte evaluar la prevalencia de polimorfismos naturales en el dominio I de la proteína NS5A del VHC, asociadas con resistencia al inhibidor de la proteína NS5A daclatasvir. Se evaluó en pacientes coinfectados VIH/VHC examinando las posibles diferencias en cuanto a prevalencia a nivel de genotipos y subtipos del VHC. Por otra parte se estudió y comparó las diferencias en cuanto a la barrera genética para el desarrollo de resistencias a los inhibidores de la proteína NS5A entre los genotipos 1a y 1b del VHC.

Para ello se amplificó la región NS5A del genoma del VHC en diferentes genotipos/subtipos y se examinó la prevalencia de aquellas mutaciones asociadas con resistencia al inhibidor de NS5A daclatasvir. Para la comparación de la barrera genética se evaluó tanto la composición de los tripletes de nucleótidos situados en codones críticos para el desarrollo de resistencias, como el número de substituciones de nucleótidos requeridas en dichos codones para adquirir resistencia a daclatasvir.

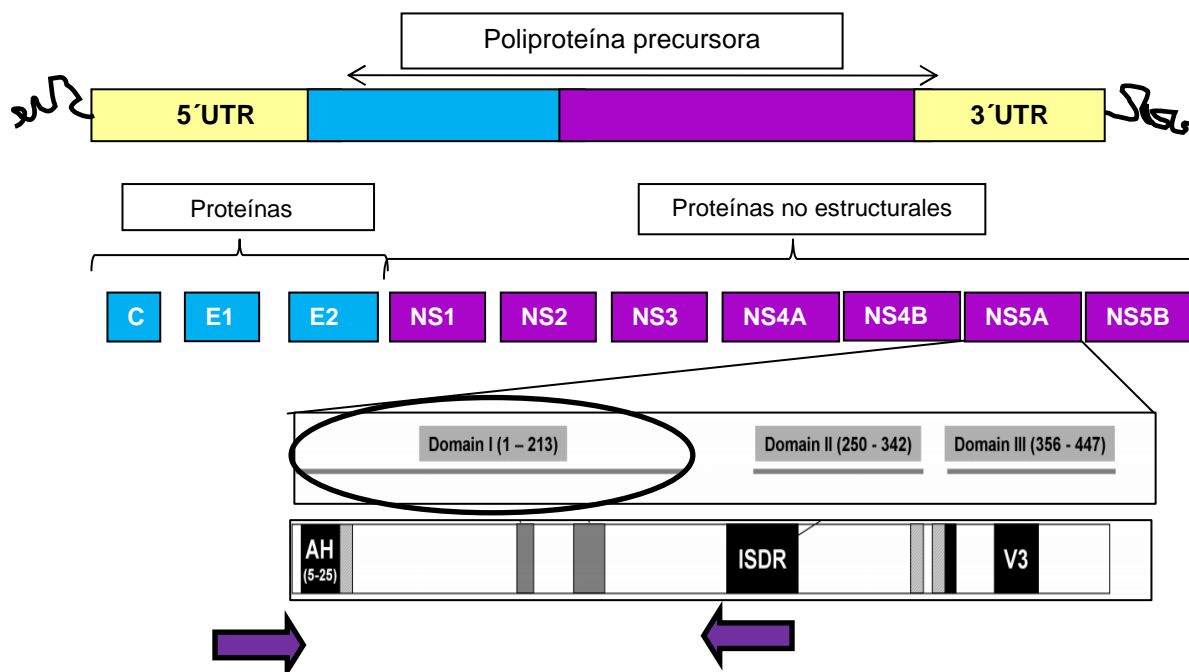
## **6.2 Pacientes y métodos**

### **6.2.1 Población de estudio**

Se identificaron todos los pacientes coinfectados VIH/VHC en seguimiento en el Hospital Carlos III (Madrid, España) que fueran naïve tanto para la terapia con IFN como a cualquier AAD.

### 6.2.2 Amplificación de la región NS5A del VHC

La NS5A es una fosfoproteína de 447 aminoácidos asociada a membrana y sin actividad enzimática conocida. Está formada por tres dominios: dominio I (aminoácidos 1-213) localizado en la región N-terminal, dominio II (aminoácidos 250-342) y dominio III (aminoácidos 356-447) en la región C terminal (7) (**Figura 12**).



**Figura 12.** Genoma del VHC donde se especifican las características de la proteína NS5A.

Se amplificó y se secuenció el dominio 1 (213 pb), a partir de plasma y usando los oligonucleótidos específicos para cada genotipo y subtipo que se detallan a continuación.

Genotipo/Subtipo viral	Cebador	Secuencia de nucleótidos (5'-3')	Sentido
1a	EF1a	GTTGGCCCCGGGCGAGGG	Forward
	ER1a	CGCCCATCTCCTGCCTCCA	Reverse
	IF1a	TCCCCACGCACTACGTG	Forward
	IR1a	GTGCAAGTTGCCTTGAGAGA	Reverse
1b	EF1b	TGGATGAACCGGCTGATAG	Forward
	ER1b	CCACARGAGGTTGGCCTC	Reverse
	IF1b	TCCCCACGCACTATGTG	Forward
	IR1b	CTAGCYGARGAGCTGGCC	Reverse
3	EF3	GAGTTCTTYACTGAGGTGGG	Forward
	ER3	GAYTCTGAGTCRGA CTC	Reverse
	IF3	GTRCTGACCTCGATGTTRAG	Forward
	IR3	CCGAGGRGGRGGCACC	Reverse
4	EF4	GGCAAYCACGTGKCTCCAC	Forward
	ER4	CTGGCTMGCCGAGGA	Reverse
	IF4	CACAAGTGGAYCAATGARGA	Forward
	IR4	GAGGGTGGTGACCC	Reverse

### **Condiciones Genotipo 1**

RT-PCR

Perfil térmico		45 ciclos
Temperatura	Tiempo	
50º	30 min	
94º	15 min	
94º	35 seg	
54º	35 seg	
72º	1min 30 seg	
72º	10min	
4º	∞	

Nested PCR

Perfil térmico		45 ciclos
Temperatura	Tiempo	
94º	3 min	
94º	35 seg	
54º	35 seg	
72º	1min 30 seg	
72º	10min	
4º	∞	

**Condiciones Genotipo 3**

RT-PCR

Perfil térmico		45 ciclos
Temperatura	Tiempo	
50º	30 min	
94º	15 min	
94º	35 seg	
53º	35 seg	
72º	1min 30 seg	
72º	10min	
4º	∞	

Nested PCR

Perfil térmico		45 ciclos
Temperatura	Tiempo	
94º	3 min	
94º	35 seg	
53º	35 seg	
72º	1min 30 seg	
72º	10min	
4º	∞	

**Condiciones Genotipo 4**

RT-PCR

Perfil térmico		45 ciclos
Temperatura	Tiempo	
50º	30 min	
94º	15 min	
94º	35 seg	
54º	35 seg	
72º	1min 30 seg	
72º	10min	
4º	∞	

Nested PCR

Perfil térmico		45 ciclos
Temperatura	Tiempo	
94º	3 min	
94º	35 seg	
54º	35 seg	
72º	1min 30 seg	
72º	10min	
4º	∞	

La prevalencia de mutaciones primarias a daclatasvir, se evaluó teniendo en cuenta aquellos cambios de aminoácidos relacionados hasta el momento con resistencia *in vitro* para genotipo 1a (M28T, Q30R/H, L31M/V, P32L, e Y93C) y genotipo 1b (L31F/V, P32L e Y93H/N) ([Gao et al., 2010](#)).

### **6.2.3 Análisis de las secuencias**

Se utilizó la secuencia H77 como secuencia de referencia para el análisis de las secuencias de genotipo 1 ([Kwong et al., 2011](#)), AB691595 para genotipo 3a y DQ418782 para genotipo 4. Las mutaciones fueron examinadas manualmente y sólo se tuvieron en cuenta aquellos cambios cuya prevalencia fuera >1%.

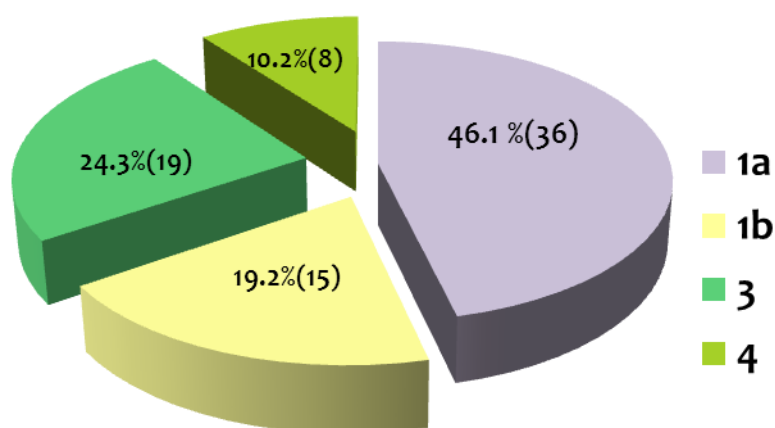
### **6.2.4 Comparación barrera genética genotipos 1a vs. 1b**

Se alinearon, por subtipos, secuencias de nucleótidos obtenidas de la base de datos de “Los Álamos” con el programa BioEdit Sequence. Posteriormente se examinaron los tripletes de nucleótidos situados en posiciones asociadas a resistencia, y se calculó el número de substituciones nucleotídicas requeridas para adquirir mutaciones que confieren resistencia a daclatasvir.

## **6.3 Resultados**

### **6.3.1 Características basales de los pacientes del estudio**

Se obtuvieron secuencias de 78 pacientes VIH/VHC coinfectados. Más de las tres cuartas partes de los pacientes eran hombres con una media de edad de 45 años. Respecto a la distribución de genotipos, más de 65% de los pacientes eran genotipo 1, siendo más prevalente los pacientes con genotipo 1a frente al genotipo 1b (**Figura 13**). Respecto a los parámetros virológicos, la media de carga viral del VHC fue de 6 log [5,6-6,4]. El 75% de los pacientes estaban en terapia antirretroviral para el VIH y el 80% tenían carga viral indetectable.



**Figura 13:** Distribución de los genotipos VHC en la población de estudio

### 6.3.2 Polimorfismos naturales asociados con resistencias a Daclatasvir

En pacientes infectados con genotipo 1a, no se encontró ninguno de los cambios asociados con resistencia a daclatasvir (**Tabla 16**). Sin embargo un paciente con genotipo 1b mostraba el doble mutante L31M+Y93H, asociado con alto grado de resistencia a daclatasvir *in vitro* (>4000 veces) ([Fridell et al., 2010](#)). Todas las secuencias de genotipo 3 presentaron una substitución en el codón 30 (Q30A) de significado desconocido.

Finalmente, un individuo con genotipo 4 presentó también la combinación L31M+Y93H. Es interesante el hecho de que todas las secuencias de NS5A de genotipo 4 presentaran la mutación L31M, asociada con alto grado de resistencia a daclatasvir (>300 veces) en replicones genotipo 1a. Además, todas las secuencias de genotipo 1b y genotipo 4 presentaron cambios en el codón 28 (M28L) y 30 (L30R), de significado incierto.

Genotipos /subtipos	n	VHC-1a					VHC-1b		
		M28 T, %	Q30 H/R, %	L31 M/V, %	P32 L, %	Y93 C, %	L31 F/V, %	P32 L, %	Y93 H/N, %
VHC-1a	36	0	0	0	0	0	0	0	0
VHC-1b	15	100 L	100 R	<b>7 M</b>	0	0	0	0	<b>7 H</b>
VHC-3	19	0	100 A	0	0	0	0	0	0
VHC-4	8	100 L	<b>100 R</b>	<b>100 M</b>	0	0	0	0	<b>13 H</b>

La fuente en negrita indica cambios específicamente asociados con resistencia a daclatasvir para cada subtipo.

**Tabla 16.** Polimorfismos naturales asociados con resistencias a Daclatasvir .

### 6.3.3 Comparación de la barrera genética de los pacientes de genotipo 1a vs. 1b

Para comparar la barrera genética de los genotipos 1a vs. 1b se evaluó la composición de los tripletes de nucleótidos situados en codones críticos asociados a resistencia, así como el número de substituciones requeridas para adquirir resistencia a daclatasvir (Tabla 17).

La selección de mutaciones que confieren un alto nivel de resistencia, requieren un único cambio de nucleótido en la mayoría de los casos. Sin embargo se requieren dos cambios de nucleótido en el 7% de los genotipos 1a para la mutación L31M y en el 18% de los genotipos 1b para la mutación L31F. Es relevante que el cambio de susceptibilidad producido por las mismas mutaciones generalmente compromete, en mayor medida la susceptibilidad a daclatasvir en el genotipo 1a comparado con los genotipos 1b.



**A)**

Genotipo	Residuo	Aminoácido "salvaje" (codón)	Mutaciones de resistencia (codón)	Fold- change (EC50)*	Número de cambios nucleotídicos	Prevalencia
<b>1a</b>	28	M(ATG)	T(A <b>CG</b> )	683	1	99,4
	30	Q(CAG)	R( <b>CG</b> G)	1.217	1	22,6
		Q(CAA)	R( <b>CG</b> A)		1	72,3
		Q(CAG)	H(CA <b>C</b> )	1450	1	22,6
		Q(CAA)	H(CA <b>T</b> )		1	72,3
		L(CTG)	M(A <b>CG</b> )		1	93,1
	31	L(CTA)	M(A <b>CG</b> )	350	2	6,3
		L(CTC)	M(A <b>CG</b> )		2	0,6
		L(CTG)	V( <b>G</b> TG)		1	93,1
		L(CTA)	V( <b>G</b> TA)	3.350	1	6,3
		L(CTC)	V( <b>G</b> TC)		1	0,6
	32	P(CCC)	L( <b>CT</b> C)	233	1	100
	93	Y(TAC)	C(T <b>G</b> C)	1.850	1	96,9
		Y(TAT)	C(T <b>G</b> T)		1	2,5
		H(CAC)	C(T <b>G</b> C)		2	0,6

**B)**

Genotipo	Residuo	Aminoácido "salvaje" (codón)	Mutaciones de resistencia (codón)	Fold- change (EC50)*	Número de cambios nucleotídicos	Prevalencia
<b>1b</b>	31	L(CTG)	V( <b>G</b> TG)	3	1	12,2
		L(TTG)	V( <b>G</b> TG)		1	42,8
		L(TTA)	V( <b>G</b> TA)		1	34,7
		L(CTA)	V( <b>G</b> TA)		1	1,8
		M(ATG)	V( <b>G</b> TG)		1	4,1
		L(TTA)	F(TT <b>C</b> )(TTT)	5	1	34,7
		L(TTG)	F(TTT)		1	42,8
		L(CTG)	F(TT <b>C</b> )(TTT)		2	12,2
		L(CTA)	F(TT <b>C</b> )(TTT)		2	1,8
		M(ATG)	F(TTT)(TT <b>C</b> )		2	4,1
	32	P(CCC)	L(CT <b>C</b> )	17	1	99,9
	93	Y(TAC)	H(C <b>A</b> C)	19	1	91,8
		Y(TAT)	H(C <b>A</b> T)		1	1,8
		Y(TAC)	N(A <b>A</b> C)	28	1	91,8
		Y(TAT)	N(A <b>A</b> T)		1	1,8
		H(CAC)	N(A <b>A</b> C)		1	6,1

EC50\*Concentración media efectiva: concentración del fármaco que induce una respuesta intermedia entre la concentración basal y la máxima obtenida tras la exposición por un tiempo determinado al fármaco; Fold-change: cuanto aumenta el EC50 del fármaco desde el valor inicial al final; La combinación Y93H+L31M tiene un fold –change de >4000(8).

**Tabla 17:** Número de cambios nucleotídicos necesarios para seleccionar mutaciones asociadas con resistencia a daclatasvir en secuencias de NS5A de genotipos 1a (A) y 1b (B).

## 6.4 Discusión

Este estudio evalúa la prevalencia de cambios naturales en el dominio 1 de la NS5A asociados con resistencia al inhibidor de la proteína NS5B daclatasvir en 78 pacientes

VIH/VHC coinfectados, previamente expuestos a tratamiento con INFp $\alpha$ /RBV y naïve para la terapia con AAD.

De forma basal, la prevalencia de mutaciones de resistencia en las secuencias de NS5A difiere entre los distintos genotipos/subtipos del VHC, con independencia del estatus de la infección por VIH. Aunque las secuencias de NS5A pertenecientes al genotipo 1a no presentaron ningún cambio de resistencia a daclatasvir, el doble mutante L31M+Y93H asociado con un alto grado de resistencia, estuvo presente en un 7% de los genotipos 1b y en un 13% de los genotipos 4. Además todas las secuencias de NS5A de genotipo 4 presentaban la mutación L31M, asociada a un alto nivel de resistencia a daclatasvir en los replicones de genotipo 1a. Más aún, todas las secuencias de genotipo 1b y 4 presentaron cambios en los codones 28 (M28L) y 30 (L30R). Igualmente, todas las secuencias de genotipo 3 presentaron una substitución aminoacídica en el codón 30 (Q30A). En general, la frecuencia de polimorfismos naturales asociados a resistencia a daclatasvir en la población coinfectada fue similar a la encontrada en secuencias de NS5A depositadas en la base de datos de “Los Álamos” cuyos resultados se mostraron en el estudio 1. Sólo la combinación L31M+Y93H (presente en un 7% de los genotipos 1b y en un 13% de los genotipos 4 de los pacientes coinfectados) fue menos prevalente en las secuencias obtenidas de la base de datos de “Los Álamos” (0,6%).

[Sun J et al., 2012](#) han examinado *in vitro* el impacto de los polimorfismos naturales presentes en la proteína NS5A sobre la respuesta clínica a daclatasvir en genotipos 1. En este estudio se ha demostrado que la presencia de polimorfismos basales en la proteína NS5A con un impacto mínimo en la resistencia a daclatasvir podría inducir la emergencia de variantes resistentes durante la terapia con este inhibidor.

En ensayos clínicos en fase II, la actividad antiviral de este inhibidor fue testada en sujetos infectados con genotipo 1 del VHC. De forma interesante, las mejores respuestas fueron observadas en pacientes con genotipo 1b, con más fracasos en aquellos infectados con genotipo 1a, como se ha reportado en otros estudios, usando otros AAD como los inhibidores de la proteasa NS3 y los inhibidores de la polimerasa no análogos de nucleósidos ([De Meyer et al., 2011](#); [Zeuzem et al., 2010](#)). Aunque se desconocen los mecanismos exactos que podrían explicar estos hallazgos, una mayor prevalencia de polimorfismos naturales asociados con resistencia a daclatasvir en los genotipos 1a que en los genotipos 1b podría explicar en parte esta diferente susceptibilidad a daclatasvir entre subtipos. Sin embargo, algunos polimorfismos naturales involucrados en la resistencia a daclatasvir (L31M e Y93H) los encontramos en los genotipos 1b (7%) pero no en pacientes con genotipo 1a. En el caso de los inhibidores de la proteasa para VHC telaprevir y boceprevir, las diferencias nucleotídicas en el codón 155 explican en parte la menor barrera genética para el desarrollo de resistencias en los genotipos 1a versus los genotipos 1b ([Soriano et al., 2011](#); [De Meyer et al., 2011](#)). Sin embargo en nuestro estudio, no hemos podido encontrar diferencias semejantes examinando codones de NS5A implicados en resistencia a daclatasvir. Además el número de substituciones nucleotídicas necesarios para dar lugar a cambios aminoacídicos en posiciones de resistencia fue comparable en los genotipos 1a y los 1b. Por lo tanto, los resultados de nuestro trabajo concluyen que el análisis de las secuencias de NS5A, en relación a la presencia de polimorfismos asociados con resistencia o al número de substituciones nucleotídicas para seleccionar estas mutaciones, no pueden explicar por sí solas las diferencias en el comportamiento entre los subtipos 1a y 1b con respecto a la respuesta clínica a daclatasvir.

Con respecto a otros mecanismos que pudieran contribuir a explicar la diferente actividad de daclatasvir frente a distintas variantes de VHC, existen dos que merecen especial atención. El primero de ellos es que en el sistema de replicón la pérdida de susceptibilidad a daclatasvir asociada con selección de mutaciones de resistencia en la NS5A es más alta en los genotipos 1a (variando de 233-3.350 veces) que en los genotipos 1b (variando de 3-28 veces). En consecuencia, en los genotipos 1a únicamente sería necesaria una mutación de resistencia para reducir significativamente la susceptibilidad de los genotipos 1a a daclatasvir, mientras que para los genotipos 1b serían necesarias más de una. En segundo lugar, la proteína NS5A juega un papel fundamental en la replicación viral como componente esencial del complejo de replicación a través de la interacción con otras proteínas no-estructurales virales como la NS3, NS4A, NS4B y NS5B. Debido a la interacción proteína-proteína en el complejo de replicación, la presencia de polimorfismos en el dominio 1 de la región de la NS5A podría hipotéticamente influir en la susceptibilidad de las distintas variantes de VHC a daclatasvir. A este respecto, datos recientes han demostrado que la aparición de resistencias a otros inhibidores de la NS5A podría implicar la selección de mutaciones adicionales en otras posiciones de las proteínas NS3, NS4B y/o NS5B ([Schinazi et al., 2011](#)).

Una limitación del estudio es el uso de secuenciación poblacional para evaluar la prevalencia de mutaciones de resistencia a los AAD frente al VHC. En este sentido, la presencia de genomas de VHC portadores de mutaciones asociadas con resistencia a daclatasvir presentes en la población viral a una baja proporción podría no detectarse y por tanto no tenerse en cuenta en el análisis. Para detectar la presencia de variantes minoritarias se requieren otras herramientas más sensibles como son la PCR alelo-

específica o la secuenciación masiva o de alta resolución. Sin embargo, en este momento no se ha determinado el impacto de la presencia de estas mutaciones de forma minoritaria en la respuesta clínica a estas nuevas terapias frente al VHC.

En resumen, los polimorfismos naturales en la proteína NS5A en posiciones que pueden modificar la susceptibilidad a daclatasvir son muy poco prevalentes en los genotipos 1a y 3 del VHC, mientras que por el contrario, son muy comunes en los genotipos 1b y 4. Se han encontrado resultados similares en secuencias de NS5A de monoinfectados VHC depositadas en la base de datos de VHC de “Los Álamos” (estudio 1). Esta información proporciona nuevas perspectivas para entender la diferente actividad antiviral entre los distintos genotipos/subtipos de VHC.

---

Los resultados obtenidos en este estudio fueron publicados en “Antiviral Therapy” en Marzo de 2012 (Anexo II).

**Referencia:** Zulema Plaza, Vicente Soriano, Eugenia Vispo, María del Mar Gonzalez, Pablo Barreiro, Eduardo Seclén, Eva Poveda. **Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor.** Antiviral Therapy. 2012; 17(5):921-6



## CONCLUSIONES

---





1. Se reconoció una prevalencia global elevada de polimorfismos asociados con resistencia a los AAD en un total de 5790 secuencias de la proteasa NS3, la polimerasa NS5B y la proteína NS5A del VHC, recogidas en la base de datos de Los Álamos y en 194 muestras de pacientes coinfectados VIH/VHC atendidos en nuestro hospital. Fue dependiente del geno/subtipo del VHC y específica para cada familia de AAD.
2. La prevalencia de polimorfismos asociados con resistencia a los AAD fue similar en la población coinfectada VIH/VHC y en las secuencias de NS3, NS5B y NS5A de pacientes mono infectados por VHC recogidas en la base de datos de Los Álamos.
3. La prevalencia de cambios en las posiciones 36, 155 y 156 de la proteasa del VHC fue <1%. Sin embargo, fueron frecuentes los cambios Q80K (20-40%) y D168Q (99%), asociados con resistencia a simeprevir, en los genotipos 1a y 3 del VHC, respectivamente.
4. La prevalencia de polimorfismos asociados con resistencia a los inhibidores de la proteasa NS3 fue mayor en el subtipo 1a que en el subtipo 1b (23% vs. 6,2%, respectivamente), lo que probablemente contribuye a la menor actividad global de estos antivirales en el subtipo 1a respecto al 1b.

5. La prevalencia de polimorfismos asociados con resistencia a los inhibidores de la polimerasa NS5B no análogos de nucleósidos fue globalmente elevada en todas las variantes del virus C examinadas. En el genotipo 2 se observaron mutaciones asociadas con resistencia a todos los sitios de unión de la polimerasa con una frecuencia >88%. La mutación C316N, asociada con resistencia a los inhibidores de los sitios 3 y 5 de la polimerasa, fue elevada en el subtipo 1b (36%) mientras que no se observó en el subtipo 1a.
  6. No se identificaron polimorfismos asociados con resistencias a los inhibidores de la polimerasa análogos de nucleósidos en ninguna muestra.
  7. La prevalencia de polimorfismos asociados a resistencia al inhibidor de la proteína NS5A, daclatasvir, fue menor en los geno/subtipos 1a, 1b y 3 (<7%) que en los genotipos 2 y 4 (5-100%). Además, el polimorfismo Y93H, que confiere alta resistencia a daclatasvir, se observó en un 2-7% de los subtipos 1b, ocasionalmente junto al cambio L31M, que incrementa de manera muy significativa el grado de resistencia.
  8. La terapia antirretroviral prolongada para el VIH no parece influir en la variabilidad genética de la polimerasa NS5B del VHC en pacientes coinfectados VIH/VHC.
-

## **BIBLIOGRAFÍA**

---



1. Alves, R., et al., "The Presence of Resistance Mutations to Protease and polymerase Inhibitors in Hepatitis C Virus Sequences from the Los Alamos Databank". *Journal of Viral Hepatitis*, 2013. **20** (6): p. 414–421.
2. Bacon, B.R., et al., "Boceprevir for Previously Treated Chronic HCV Genotype 1 Infection". *The New England Journal of Medicine*, 2011. **364** (13):p. 1207–1217.
3. Bartenschlager, R. "Hepatitis C Virus Molecular Clones: From cDNA to Infectious Virus Particles in Cell Culture". *Current Opinion in Microbiology* , 2006. **9** (4):p. 416–422.
4. Berg, T. "Tailored Treatment for Hepatitis C." *Clinics in Liver Disease* , 2008.**12** (3) : p . 507–528
5. Bressanelli, S., et al. "Structural Analysis of the Hepatitis C Virus RNA Polymerase in Complex with Ribonucleotides." *Journal of Virology*, 2002.**76** (7):p.3482–3492.
6. Bronowicki, J.P., et al., "Asunaprevir (ASV; BMS-650032), an NS3 Protease Inhibitor, in Combination with Peginterferon and Ribavirin in Treatment-Naive Patients with Genotype 1 Chronic Hepatitis C Infection." in 47th EASL Annual Meeting. 2012: Barcelona Spain.
7. Carrat, F., et al., "Pegylated Interferon Alfa-2b Vs Standard Interferon Alfa-2b, Plus Ribavirin, for Chronic Hepatitis C in HIV-infected Patients: a Randomized Controlled Trial." *JAMA: The Journal of the American Medical Association*, 2004. **292** (23):p. 2839–2848.
8. Cento, V., et al., "HCV Genotypes Are Differently Prone to the Development of Resistance to Linear and Macrocyclic Protease Inhibitors." *PloS One*, 2012.**7** (7): e39652.
9. Coelmont, L., et al., "DEB025 (Alisporivir) Inhibits Hepatitis C Virus Replication by Preventing a Cyclophilin A Induced Cis-trans Isomerisation in Domain II of NS5A." *PloS One*, 2010.**5** (10): e13687.
10. Choo, Q.L., et al., "Isolation of a cDNA Clone Derived from a Blood-borne non-A, non-B Viral Hepatitis Genome." *Science*, 1989. **244** (4902):p.359–362.
11. Dabbouseh, N.M. and Jensen D.M., "Future Therapies for Chronic Hepatitis C." *Nature Reviews. Gastroenterology & Hepatology*, 2013. **10** (5):p.268-76.
12. De Francesco, R. and Carfi A., "Advances in the Development of New Therapeutic Agents Targeting the NS3-4A Serine Protease or the NS5B RNA-dependent RNA Polymerase of the Hepatitis C Virus." *Advanced Drug Delivery Reviews*, 2007.**59** (12):p. 1242–1262.
13. De Mendoza, C., et al., "Antiretroviral recommendations may influence the rate of transmission of drug-resistant viruses" *Clin Infect Dis*, 2005. **41**:227-32.

14. De Meyer, S.M., et al., "Deep Sequencing Screening for Telaprevir-resistant Viral Variants in Previous Null Responders Fails to Identify Those Patients at Risk of Failing Telaprevir Plus Peginterferon/ribavirin Therapy." in 47th EASL Annual Meeting. 2012: Barcelona, Spain.
15. De Meyer, S.M., et al., "Similar Incidence of Virological Failure and Emergence of Resistance with or Without a Lead-in: results of a Telaprevir Phase 3 Study in Patients Who Did Not Achieve SVR with Prior Peg-IFN/RBV Treatment." *Antiviral Therapy*, 2011.**16** (Suppl1): A25.
16. Di Maio, V., et al., "HCV Response to NS5B-polymerase Inhibitors Can Be Influenced by HCV Genetic Variability and by Natural Presence of Resistance-associated Mutations." in 10th European Meeting on HIV& Hepatitis Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance. 2012: Barcelona, Spain.
17. Dietrich, D., et al., "Treatment for 12 or 24 Weeks with BI201335 Combined with Peginterferon Alfa-2a and Ribavirin (P/R) in Treatment-naïve Patients with Chronic Genotype-1 HCV Infection." in 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011: San Francisco, CA, USA.
18. Domingo, E. and Gomez J., "Quasispecies and its Impact on Viral Hepatitis." *Virus Research*, 2007.**127** (2): p. 131–150.
19. Dustin, L.B. and Rice C.M., "Flying Under the Radar: The Immunobiology of Hepatitis C." *Annual Review of Immunology*, 2007.**25**:p. 71–99.
20. Evans, M.J., et al., "Claudin-1 Is a Hepatitis C Virus Co-receptor Required for a Late Step in Entry." *Nature*, 2007.**446** (7137):p. 801–805.
21. Everson G.T., Sims K.D., and Rodriguez-Torres M., "An Interferon-free, Ribavirin-free 12-Week Regimen of Daclatasvir (DCV), Asunaprevir (ASV), and BMS-791325 Yielded SVR4 of 94% in Treatment-Naïve Patients with Genotype (GT) 1 Chronic Hepatitis C Virus (HCV) Infection." in 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2012: Boston, MA, USA.
22. Feld, J.J., et al., "Up to 100% SVR4 Rates with Ritonavir-boosted Danoprevir (DNVr), Mericitabine and Ribavirin with or Without Peginterferon  $\alpha$ -2a (40KD) in HCV Genotype 1-infected Partial and Null Responders: Results from the MATTERHORN Study." in 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2012: Boston, MA, USA.
23. Fernandes, F., Ansari I.H. and Striker R., "Cyclosporine Inhibits a Direct Interaction Between Cyclophilins and Hepatitis C NS5A." *PloS One*, 2010.**5** (3): e9815.
24. Foster G., et al., "Four-week Treatment with GS-9256 and Tego buvir (GS-9190),  $\pm$  RBV  $\pm$  PEG, Results in Enhanced Viral Suppression on Follow-up PEG/RBV Therapy, in Genotype 1a/1b HCV Patients." in 46th EASL Annual Meeting. 2011: Berlin, Germany.

25. Franco, S., et al., "Genetic and Catalytic Efficiency Structure of an HCV Protease Quasispecies." *Hepatology*, 2007.**45** (4):p. 899–910.
26. Fridell, R.A., Qiu D., Wang C., Valera L. and Gao M., "Resistance Analysis of the Hepatitis C Virus NS5A Inhibitor BMS-790052 in an in Vitro Replicon System." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010. **54** (9): p.3641–3650.
27. Fried, M., "TMC435 in Combination with Peginterferon and Ribavirin in Treatment-naïve HCV Genotype 1 Patients: Final Analysis of the PILLAR Phase IIb Study." in 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011: San Francisco, CA, USA.
28. Fried, M.W., et al., "Peginterferon Alfa-2a Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection." *The New England Journal of Medicine*, 2002. **347** (13):p. 975–982.
29. Gane E., et al. "Vertex QUAD Therapy Yielded 83-93% SVR with 12 Weeks Duration of Therapy: VX-222/telaprevir in combination with peginterferon-alfa-2a and ribavirin in treatment naïve genotype 1 HCV patients treated for 12 weeks: ZENITH study, SVR12 interim analysis." in 22nd Conference of the Asian Pacific Association for the Study of the Liver. 2012a: Taipei, Taiwan.
30. Gane, E., et al., "Interferon-free Treatment with a Combination of Mericitabine and danoprevir/R with or Without Ribavirin in Treatment-naïve HCV Genotype 1-infected Patients." *Journal of Hepatology*. 2012b. **56**: S553; A1412.
31. Gane, E.J., et al., "Oral Combination Therapy with a Nucleoside Polymerase Inhibitor (RG7128) and Danoprevir for Chronic Hepatitis C Genotype 1 Infection (INFORM-1): a Randomised, Double-blind, Placebo-controlled, Dose-escalation Trial." *Lancet*, 2010. **376** (9751):p.1467–1475.
32. Gane, E.J., et al., "Nucleotide Polymerase Inhibitor Sofosbuvir Plus Ribavirin for Hepatitis C." *The New England Journal of Medicine*, 2013.**368** (1):p. 34–44.
33. Gao, M., et al., "Chemical Genetics Strategy Identifies an HCV NS5A Inhibitor with a Potent Clinical Effect." *Nature*, 2010. **465** (7294): p.96–100.
34. Graham, D., et al., "MK-5172, a Second Generation HCV NS3/4a Protease Inhibitor Is Active against Common Resistance Associated Variants (RAVS) and Exhibits Cross-genotype Activity." in 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011: San Francisco, CA, USA.
35. Hadziyannis, S.J., et al., "Peginterferon-alpha2a and Ribavirin Combination Therapy in Chronic Hepatitis C: a Randomized Study of Treatment Duration and Ribavirin Dose." *Annals of Internal Medicine*, 2004. **140** (5): p.346–355.
36. Hebner, C.M., et al., "The HCV non-nucleoside inhibitor Tegobuvir utilizes a novel mechanism of action to inhibit NS5B polymerase function." *Plos One*, 2012. **7**(6):e39163



37. Herlihy, K.J., et al., "Development of Intergenotypic Chimeric Replicons to Determine the Broad-spectrum Antiviral Activities of Hepatitis C Virus Polymerase Inhibitors." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008. **52** (10):p. 3523–3531.
38. Huang, H., et al., "Hepatitis C Virus Production by Human Hepatocytes Dependent on Assembly and Secretion of Very Low-density Lipoproteins." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2007. **104** (14): p. 5848–5853.
39. Jacobson, I., et al., "Virologic Response Rates Following 4 Weeks of Fildesivir in Combination with Pegylated Interferon Alfa-2a and Ribavirin in Chronically Infected HCV Genotype 1 Patients." *Journal of Hepatology*, 2010. **52**, Suppl: 465.
40. Jacobson, I.M., et al., "Telaprevir for Previously Untreated Chronic Hepatitis C Virus Infection." *The New England Journal of Medicine*, 2011.**364**, 25:p. 2405–2416.
41. Janssen, et al., "Treatment of HCV Infection by Targeting microRNA." *The New England Journal of Medicine*, 2013. **368** (18):p. 1685–1694.
42. Kieffer, T., et al., "Clinical Virology Findings from Treatment-naïve and Treatment-experienced Genotype 1 HCV Patients Receiving Telaprevir/peginterferon/ribavirin in Phase 3 Clinical Trials." *Antiviral Therapy*, 2011.**16**: Suppl: 1:A27.
43. Kieffer, T.L., Kwong A.D. and Picchio G.R., "Viral Resistance to Specifically Targeted Antiviral Therapies for Hepatitis C (STAT-Cs)." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2010. **65** (2): p.202–212.
44. Kowdley, K.V., et al., "A 12-week Interferon-free Treatment Regimen With ABT-450/r, ABT 267, ABT-333, and Ribavirin Achieves SVR12 Rates (Observed Data) of 99% in Treatment-naïve Patients and 93% in Prior Null Responders With HCV Genotype 1 Infection." in 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2012: Boston, MA, USA.
45. Kukolj, G., et al., "Binding Site Characterization and Resistance to a Class of Non-nucleoside Inhibitors of the Hepatitis C Virus NS5B Polymerase." *The Journal of Biological Chemistry* ,2005. **280** (47): p.39260–39267.
46. Kwong, A.D., et al., "Sequence and Phenotypic Analysis for Resistance Monitoring in Hepatitis C Virus Drug Development: Recommendations from the HCV DRAG." *Gastroenterology*, 2011. **140** (3): p.755–760.
47. Lagacé, L., et al., "In Vitro Resistance Profile of the Hepatitis C Virus NS3 Protease Inhibitor BI 201335." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012.**56** (1): p.569–572.
48. Lam, A., et al., "HCV Replicon Resistance for PSI-352938 and PSI-353661, Prodrugs of 2'-F-2'-C-methylguanosine, Is Mediated through Multiple Amino Acid Changes." *Antiviral Therapy*, 2011. **16**, Suppl: 1: A23.

49. Larrey, D., et al., "4-week Therapy with the Non-nucleoside Polymerase Inhibitor BI-207127 in Combination with Peginterferon  $\alpha$ -2a and Ribavirin in Treatment Naïve and Treatment Experienced Chronic HCV GT1 Patients." *Journal of Hepatology*, 2010b. **52**, Suppl: 466.
50. Larrey, D., et al., "BI-207127 Is a Potent HCV RNA Polymerase Inhibitor During 5 Days Monotherapy in Patients with Chronic Hepatitis C." in 61st Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2010a: Boston, MA, USA.
51. Lawitz, E., et al., "Once-daily PSI-7977 Plus peg/RBV in Treatment-naïve Patients with HCV GT1: Robust End of Treatment Response Rates Are Sustained Post-treatment." in 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011a: San Francisco, CA, USA.
52. Lawitz, E., et al., "A Phase 2b Trial Comparing 24 to 48 Weeks Treatment with Tegobuvir (GS-9190)/peg/RBV to 48 Weeks Treatment with PEG/RBV for Chronic Genotype 1 HCV Infection." in 46th EASL Annual Meeting. 2011b: Berlin, Germany.
53. Lawitz, E., et al., "A 12-week Interferon-free Regimen of ABT-450/r, ABT-072, and Ribavirin Was Well Tolerated and Achieved Sustained Virologic Response in 91% Treatment-naïve HCV IL28B-CC Genotype-1-infected Subjects." in 47th EASL Annual Meeting. 2012a: Barcelona, Spain.
54. Lawitz, E., et al., "Safety and Antiviral Activity of ABT-267, a Novel NS5A Inhibitor, during 3-day Monotherapy: First Study in HCV Genotype-1 (GT1)-infected Treatment-naïve Subjects." *Journal of Hepatology*, 2012b; **56**:S469–70.
55. Le Pogam, S., et al., "Existence of Hepatitis C Virus NS5B Variants Naturally Resistant to Non-nucleoside, but Not to Nucleoside, Polymerase Inhibitors among Untreated Patients." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008. **61** (6):p. 1205–1216.
56. Legrand-Abravanel, F., et al., "Naturally Occurring Substitutions Conferring Resistance to Hepatitis C Virus Polymerase Inhibitors in Treatment-naïve Patients Infected with Genotypes 1-5." *Antiviral Therapy*, 2009.**14** (5): p.723–730.
57. Lenz, O., et al., "TMC435 in Patients Infected with HCV Genotype 1 Who Have Failed Previous Pegylated Interferon/ribavirin Treatment: virologic Analyses of the ASPIRE Trial." in 47th EASL Annual Meeting. 2012: Barcelona, Spain.
58. Lenz, O., et al., "Virological Response and Characterization of HCV Genotypes 2 to 6 Under TMC-435 Monotherapy (study TMC-435-C202)." *Antiviral Therapy*, 2011.**16** (Suppl 1): A24.
59. Lenz, O., et al., "In Vitro Resistance Profile of the Hepatitis C Virus NS3/4A Protease Inhibitor TMC435." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2010.**54** (5): p.1878–1887.
60. Lok, A.S., et al., "Preliminary Study of Two Antiviral Agents for Hepatitis C Genotype 1." *The New England Journal of Medicine*, 2012. **366** (3): p.216–224.

61. Manns, M.P., et al., "Peginterferon Alfa-2b Plus Ribavirin Compared with Interferon Alfa-2b Plus Ribavirin for Initial Treatment of Chronic Hepatitis C: a Randomised Trial." *Lancet*, 2001. **358** (9286): p.958–965.
62. Marcellin, P., et al., "Telaprevir Is Effective Given Every 8 or 12 Hours with Ribavirin and Peginterferon Alfa-2a or -2b to Patients with Chronic Hepatitis C." *Gastroenterology*, 2011. **140** (2):p.459–468.e1; quiz e14.
63. Margeridon-Thermet, S. and Shafer R.W., "Comparison of the Mechanisms of Drug Resistance Among HIV, Hepatitis B, and Hepatitis C." *Viruses*, 2010.**2** (12): 2696–2739.
64. McCown, M.F., et al., "GT-1a or GT-1b Subtype-specific Resistance Profiles for Hepatitis C Virus Inhibitors Telaprevir and HCV-796." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2009. **53** (5):p. 2129–2132.
65. McCown, M.F., et al., "The Hepatitis C Virus Replicon Presents a Higher Barrier to Resistance to Nucleoside Analogs than to Nonnucleoside Polymerase or Protease Inhibitors." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2008.**52** (5): p.1604–1612.
66. McHutchison, J.G., et al., "Peginterferon Alfa-2b or Alfa-2a with Ribavirin for Treatment of Hepatitis C Infection." *The New England Journal of Medicine*, 2009.**361** (6):p. 580–593.
67. Mongue, S. et al., "Analysis of transmitted drug resistance in Spain in the years 2007–2010 documents a decline in mutations to the non-nucleoside drug class". *Clin Microbiol Infect.* , 2012. **18**(11):E485–90
68. Moradpour, D., Penin, F. and Rice C.M., "Replication of Hepatitis C Virus." *Nature Reviews. Microbiology*, 2007.**5** (6): p.453–463.
69. Nelson, D., et al., "Once Daily PSI-9777 Plus pegIFN/RBV in HCV GT1: 98% Rapid Virologic Response, Complete Early Virologic Response: PROTON Study." in 46th EASL Annual Meeting. 2011: Berlin, Germany.
70. Penin, F., "Structural Biology of Hepatitis C Virus." *Clinics in Liver Disease*, 2003. **7** (1): p.1–21.
71. Penin, F., et al., "Structural Biology of Hepatitis C Virus." *Hepatology*, 2004. **39** (1): p.5–19.
72. Pileri, P., et al., "Binding of Hepatitis C Virus to CD81." *Science*, 1998.**282** (5390):p. 938–941.
73. Ploss, A., et al., "Human Occludin Is a Hepatitis C Virus Entry Factor Required for Infection of Mouse Cells." *Nature*, 2009. **457** (7231):p. 882–886.
74. Pockros, P., et al., "First SVR Data with the Nucleoside Analogue Polymerase Inhibitor Mericitabine (RG-7128) Combined with Peginterferon/ribavirin in Treatment-naïve

- HCV G1/4 Patients: Interim Analysis from the JUMP-C Trial.” in 46th EASL Annual Meeting. 2011: Berlin, Germany.
75. Poordad, F., et al., “ABT-072 or ABT-333 Combined with Pegylated Interferon/ribavirin after 3-day Monotherapy in HCV Genotype 1 (GT1)-infected Treatment-naïve Subjects: 12-week Sustained Virologic Response (SVR12).” in 47th EASL Annual Meeting. 2012a: Barcelona, Spain.
76. Poordad, F., et al., “12-week Interferon-free Regimen of ABT-450/r + ABT-333 + Ribavirin Achieved SVR12 in more Than 90% of Treatment-naïve HCV Genotype-1-infected Subjects and 47% of Previous Non-responders.” in 47th EASL Annual Meeting. 2012b: Barcelona, Spain.
77. Poordad, F., et al., “Boceprevir for Untreated Chronic HCV Genotype 1 Infection.” *The New England Journal of Medicine*, 2011.**364** (13):p. 1195–1206.
78. Poveda, E., et al., “Predicted Effect of Direct Acting Antivirals in the Current HIV-HCV-coinfected Population in Spain.” *Antiviral Therapy*, 2012. **17** (3):p. 571–575.
79. Rodriguez-Torres, M., et al., “Sofosbuvir (GS-7977) Plus Peginterferon/ribavirin in Treatment-naïve Patients with HCV Genotype 1: A Randomized, 28-day, Dose-ranging Trial.” *Journal of Hepatology*, 2012. **58** (4):p.663-8
80. Ross-Thriepand, D., Amako, Y. and Harris M., “The C-terminus of NS5A Domain II Is a Key Determinant of Hepatitis C Virus Genome Replication, but Is Not Required for Virion Assembly and Release.” *The Journal of General Virology*, 2013. **94** (Pt 5):p.1009-18
81. Ruiz-Sancho, A. and Soriano, V., “[HIV and HCV Coinfection].” *Enfermedades Infecciosas Y Microbiología Clínica*, 2006. **24** (5): p335–345; quiz 346.
82. Sarrazin, C., et al., “Dynamic Hepatitis C Virus Genotypic and Phenotypic Changes in Patients Treated with the Protease Inhibitor Telaprevir.” *Gastroenterology*, 2007. **132** (5): p.1767–1777.
83. Sarrazin, C. and Zeuzem, S., “Resistance to Direct Antiviral Agents in Patients with Hepatitis C Virus Infection.” *Gastroenterology*, 2010.**138** (2):p. 447–462.
84. Scarselli, E., et al., “The Human Scavenger Receptor Class B Type I Is a Novel Candidate Receptor for the Hepatitis C Virus.” *The EMBO Journal*, 2002.**21** (19): p.5017–5025.
85. Schinazi, R.F., et al., “Synthesis and Characterization of Picomolar Inhibitors of HCV NS5A in Hepatocytes.” *Antiviral Therapy*, 2011.**16** (Suppl 1): A22.
86. Sherman, K.E., et al., “Response-guided Telaprevir Combination Treatment for Hepatitis C Virus Infection.” *The New England Journal of Medicine*, 2011. **365** (11):p. 1014–1024.

87. Shih, I-H., et al., "Mechanistic Characterization of GS-9190 (Tegobuvir), a Novel Nonnucleoside Inhibitor of Hepatitis C Virus NS5B Polymerase." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 2011. **55** (9):p. 4196–4203.
88. Simmonds, P., et al., "Classification of Hepatitis C Virus into Six Major Genotypes and a Series of Subtypes by Phylogenetic Analysis of the NS-5 Region." *The Journal of General Virology*, 1993. **74** (Pt 11): p.2391–2399.
89. Simmonds, P., "Genetic Diversity and Evolution of Hepatitis C Virus--15 Years On." *The Journal of General Virology*, 2004.**85** (Pt 11): p.3173–3188.
90. Soriano, V., et al., "The Efficacy and Safety of the Interferon- Free Combination of BI-201335 and BI-207127 in Genotype 1 HCV Patients with Cirrhosis - Interim Analysis from SOUND-C2." in 47th EASL Annual Meeting. 2012: Barcelona, Spain.
91. Soriano, V., et al., "Spontaneous Viral Clearance, Viral Load, and Genotype Distribution of Hepatitis C Virus (HCV) in HIV-infected Patients with anti-HCV Antibodies in Europe." *The Journal of Infectious Diseases*, 2008b.**198** (9): p.1337–1344.
92. Soriano, V., Perelson, A.S. and Zoulim, F., "Why Are There Different Dynamics in the Selection of Drug Resistance in HIV and Hepatitis B and C Viruses?" *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2008a. **62** (1):p. 1–4.
93. Soriano, V., et al., "Directly Acting Antivirals Against Hepatitis C Virus." *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 2011.**66** (8):p. 1673–1686.
94. Stedman, C.A., "Current Prospects for Interferon-free Treatment of Hepatitis C in 2012." *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 2013. **28** (1):p. 38–45.
95. Steinmann, E., et al., "Hepatitis C Virus P7 Protein Is Crucial for Assembly and Release of Infectious Virions." *PLoS Pathogens*, 2007. **3** (7): e103.
96. Steinmann, E. and Pietschmann, T., "Hepatitis C Virus P7-a Viroporin Crucial for Virus Assembly and an Emerging Target for Antiviral Therapy." *Viruses*, 2010.**2** (9): p.2078–2095.
97. Strahotin, C.S. and Babich, M., "Hepatitis C Variability, Patterns of Resistance, and Impact on Therapy." *Advances in Virology*, 2012:p. 267483.
98. Sulkowski, M.S., et al., "High Rate of Sustained Virologic Response with the All-oral Combination of Daclatasvir (NS5a Inhibitor) Plus Sofosbuvir (nucleotide NS5b Inhibitor), with or Without Ribavirin, in Treatment-naïve Patients Chronically Infected with HCV GT 1, 2, or 3." in 63rd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2012b: Boston, MA, USA
99. Sulkowski, M., et al., "High Sustained Virologic Response Rate in Treatment-naïve HCV Genotype 1a and 1b Patients Treated for 12 Weeks with an Interferon-free All-oral Quad Regimen: Interim Results." in 47th EASL Annual Meeting. 2012a: Barcelona, Spain.

100. Sulkowski, M.S., et al., "Treatment with the Second Generation HCV Protease Inhibitor BI201335 Results in High and Consistent SVR Rates—results from SILEN-C1 in Treatment Naïve Patients Across Different Baseline Factors." in 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011a: San Francisco, CA, USA.
101. Sulkowski, M.S., et al., "SILEN-C2: Sustained Virologic Response and Safety of BI-201335 Combined with Peginterferon  $\alpha$ -2a and Ribavirin (P/R) in Chronic HCV Genotype 1 Patients with Non-response to P/R." *Journal of Hepatology*, 2011b. **54** (Suppl. 1) 30.
102. Sullivan, J.C., et al., "Evolution of Treatment-Emergent Resistant Variants in Telaprevir Phase 3 Clinical Trials." *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2013. **57**(2):p.221-9.
103. Summa, V, et al., "MK-5172, a Selective Inhibitor of Hepatitis C Virus NS3/4a Protease with Broad Activity across Genotypes and Resistant Variants." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012. **56**(8): p.4161–4167.
104. Sun, J., et al., "Impact of a Baseline Polymorphism on the Emergence of Resistance to the Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5a Replication Complex Inhibitor, BMS-790052." *Hepatology*, 2012. **55** (6):p. 1692–1699.
105. Susser, S., et al., "Characterization of Resistance to the Protease Inhibitor Boceprevir in Hepatitis C Virus-infected Patients." *Hepatology* 2009.**50** (6):p. 1709–1718.
106. Suzuki, F., et al., "Prevalence of Hepatitis C Virus Variants Resistant to NS3 Protease Inhibitors or the NS5A Inhibitor (BMS-790052) in Hepatitis Patients with Genotype 1b." *Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology*, 2012. **54** (4):p. 352–354.
107. Tatum, H.A., et al., "A Phase 2a Study of BMS-791325, an NS5B Polymerase Inhibitor, With Peginterferon Alfa-2a and Ribavirin in Treatment-Naïve Patients with Genotype 1 Chronic Hepatitis C Virus Infection." in 47th EASL Annual Meeting. 2012: Barcelona, Spain.
108. Terrault, N., et al., "High Sustained Virologic Response (SVR24) Rates with Response-guided Danoprevir (DNV; RG7227) Plus PegIFN A-2a (40KD) and Ribavirin (P/R) in Treatment-naïve HCV Genotype 1 (G1) Patients: Results from the ATLAS Study." in 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011: San Francisco, CA, USA.
109. Torriani, F.J., et al., "Peginterferon Alfa-2a Plus Ribavirin for Chronic Hepatitis C Virus Infection in HIV-infected Patients." *The New England Journal of Medicine*, 2004. **351** (5):p. 438–450.
110. Vermehren, J. and Sarrazin C., "The Role of Resistance in HCV Treatment." *Best Practice & Research. Clinical Gastroenterology*, 2012.**26** (4):p. 487–503.

111. Vieyres, G., et al., "Subcellular Localization and Function of an Epitope-Tagged P7 Viroporin in Hepatitis C Virus-Producing Cells." *Journal of Virology*, 2013. **87** (3): p.1664–1678.
112. Wang, C., et al., "In Vitro Activity of BMS-790052 on Hepatitis C Virus Genotype 4 NS5A." *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2012.**56** (3): p.1588–1590.
113. Wong, K.A., et al., "Persistence of NS5A GS-5885 Drug Resistance Mutations Following 3 Days of Monotherapy in Genotype-1 HCV Patients Is Dependent on the HCV Subtype and Specific Mutation." *Journal of Hepatology*, 2012. **56**:S482.
114. Zeuzem, S., et al., "Virologic Response to an Interferon-free Regimen of BI201335 and BI207127, with and Without Ribavirin, in Treatment-naïve Patients with Chronic Genotype-1 HCV Infection: Week12 Interim Results of the SOUND-C2 Study." in 62nd Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases. 2011b: San Francisco, CA, USA.
115. Zeuzem, S., et al., "TMC435 with Peginterferon and Ribavirin in Treatment-experienced HCV Genotype 1 Patients: The ASPIRE Study, a Randomised Phase IIb Trial." in 47th EASL Annual Meeting. 2012a: Barcelona, Spain.
116. Zeuzem, S., et al., "SVR4 and SVR12 with an Interferon- Free Regimen of BI-201335 and BI-207127 ± Ribavirin in Treatment- Naïve Patients with Genotype 1 HCV Infection: Interim Results of SOUND-C2." in 47th EASL Annual Meeting.2012b: Barcelona, Spain.
117. Zeuzem, S., et al., "Telaprevir for Retreatment of HCV Infection." *The New England Journal of Medicine*, 2011a.**364** (25):p. 2417–2428.

## **ABREVIATURAS**

---





A: Aminoácido Alanina

AAD: Antivirales de Acción Directa

ARN: Ácido ribonucleico

ARV: Antirretrovirales

BID: Administración del fármaco dos veces al día

BOC: Boceprevir

C: Aminoácido Cisteína

D: Aminoácido Aspártico

DAA: Direct antivirals agents

DMSO: Dimetilsulfóxido

EC<sub>50</sub>: Concentración media máxima efectiva, hace referencia a la concentración de droga que induce una respuesta intermedia entre la concentración basal y la máxima después de un tiempo específico de exposición.

E: Aminoácido Glutámico

EDTA: Ácido Etilendiaminotetraácetico

eRVR: Respuesta Viroológica Rápida Extendida

F: Aminoácido Fenilalanina

FDA: Food and Drug Administration

G: Aminoácido Glicina

H: Aminoácido Histidina

HCV-RNA: Carga viral de RNA

HDL: Lipoproteínas de alta densidad

I: Aminoácido Isoleucina

IC<sub>50</sub>: Concentración máxima inhibitoria, hace referencia a la concentración del fármaco necesaria para inhibir el 50% de las cepas virales.

IFNpeg: Interferón alfa pegilado

IP: Inhibidores de la Proteasa del VHC

IQR: Interquartile range, Rango intercuartílico

ITIANs: Inhibidores de la transcriptasa inversa análogos de nucleósido

ITINANs: Inhibidores de la transcriptasa inversa no análogos de nucleósido

K: Aminoácido Lisina

L: Aminoácido Leucina

LDL: Lipoproteínas de baja densidad

LDLR: Receptor de lipoproteínas de baja densidad

M: Aminoácido Metionina

N: Aminoácido Asparragina

NI: *nucleot(s)ide inhibitor*, Inhibidor análogo de nucleot(s)ido

NNI-1: *Non-nucleot(s)ide inhibitor site-1*, Inhibidor no análogo de nucleot(s)ido del sitio- 1

NNI-2: *Non-nucleot(s)ide inhibitor site-2*, Inhibidor no análogo de nucleot(s)ido del sitio- 2

NNI-3: *Non-nucleot(s)ide inhibitor site-3*, Inhibidor no análogo de nucleot(s)ido del sitio- 3

NNI-4: *Non-nucleot(s)ide inhibitor site-4*, Inhibidor no análogo de nucleot(s)ido del sitio- 4

NNI-5: *Non-nucleot(s)ide inhibitor site-5*, Inhibidor no análogo de nucleot(s)ido del sitio- 5

NR: Pacientes no respondedores a la terapia con Interferón alfa pegilado y ribavirina

P: Aminoácido Prolina

PCR: *Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa

Q: Aminoácido Glutamina

QD: Administración del fármaco una vez al día

R: Aminoácido Arginina

RVB: Ribavirina

RT-PCR: *Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*, Reacción en Cadena de la Polimerasa en Transcripción Reversa

RVS: Respuesta Viroológica Sostenida

RVS<sub>12</sub>: Respuesta virológica sostenida a semana 12

RVT: Respuesta Viroológica Temprana

S: Aminoácido Serina

Sofosbuvir: SOF

T: Aminoácido Treonina

TE: *Treatment experienced*. Pacientes pretratados con Interferón alfa pegilado y ribavirina

TGR: Terapia Guiada por Respuesta

TVR: Telaprevir

UI: Unidades internacionales

UTR: Región no codificante del genoma del virus de la hepatitis C

V: Aminoácido Valina

VDLD: Lipoproteínas de muy baja densidad

VHC: Virus de la Hepatitis C

VIH: Virus de la Inmunodeficiencia Humana

W: Aminoácido Triptófano

Y: Aminoácido Tirosina



## **ANEXOS**

---



**ANEXO I. Publicaciones surgidas de esta tesis**

1: Di Lello FA, Neukam K, Parra-Sanchez M, Plaza Z, Soriano V, Cifuentes C, Mira JA, Poveda E, Pineda JA. Hepatitis C virus genotype 4 in Southern and Central Spain does not originate from recent foreign migration waves. *J Med Virol*. 2013 Oct; 85(10):1734-40.

2: Sánchez C, Plaza Z, Vispo E, de Mendoza C, Barreiro P, Fernández-Montero JV, Labarga P, Poveda E, Soriano V. Scaling up epidemics of acute hepatitis C and syphilis in HIV-infected men who have sex with men in Spain. *Liver Int*. 2013 May 15.

3: Plaza Z, Aguilera A, Mena A, Vispo E, Sierra-Enguita R, Tomé S, Pedreira J, Rodriguez C, Barreiro P, Del Romero J, Soriano V, Poveda E. Influence of HIV infection on response to tenofovir in patients with chronic hepatitis B. *AIDS*. 2013 May 10.

4: Di Lello FA, Macias J, Plaza Z, García-Rey S, Soriano V, Cifuentes C, González Mdel M, Parra-Sánchez M, Labarga P, Recio E, Poveda E, Pineda JA. No influence of antiretroviral therapy on the mutation rate of the HCV NS5B polymerase in HIV/HCV-coinfected patients. *Antiviral Res*. 2012 Aug; 95(2):67-71.

5: Plaza Z, Soriano V, Vispo E, del Mar Gonzalez M, Barreiro P, Seclén E, Poveda E. Prevalence of natural polymorphisms at the HCV NS5A gene associated with resistance to daclatasvir, an NS5A inhibitor. *Antivir Ther*. 2012; 17(5):921-6.

6: Plaza Z, Soriano V, Gonzalez Mdel M, Di Lello FA, Macias J, Labarga P, Pineda JA, Poveda E. Impact of antiretroviral therapy on the variability of the HCV NS5B polymerase in HIV/HCV co-infected patients. *J Antimicrob Chemother*. 2011 Dec; 66(12):2838-42.



7: Treviño A, de Mendoza C, Parra P, Rodríguez C, Madejón A, Plaza Z, del Romero J, Poveda E, Soriano V. Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against HCV in newly diagnosed HIV-HCV-coinfected patients. *Antivir Ther.* 2011; 16(3):413-6.

8: Martín-Carbonero L, Teixeira T, Poveda E, Plaza Z, Vispo E, González-Lahoz J, Soriano V. Clinical and virological outcomes in HIV-infected patients with chronic hepatitis B on long-term nucleos(t)ide analogues. *AIDS.* 2011 Jan 2; 25(1):73-9.

**ANEXO II. Copia de las publicaciones relacionadas con esta tesis**

## Short communication

# Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against HCV in newly diagnosed HIV-HCV-coinfected patients

Ana Treviño<sup>1</sup>, Carmen de Mendoza<sup>1</sup>, Patricia Parra<sup>1</sup>, Carmen Rodríguez<sup>2</sup>, Antonio Madejón<sup>1</sup>, Zulema Plaza<sup>1</sup>, Jorge del Romero<sup>2</sup>, Eva Poveda<sup>1</sup>, Vincent Soriano<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Infectious Diseases Department, Hospital Carlos III, Madrid, Spain

<sup>2</sup>Centro Sanitario Sandoval, Madrid, Spain

\*Corresponding author e-mail: vsoriano@dragonet.es

**Background:** Direct acting antivirals (DAA) targeting the HCV serine protease and RNA polymerase have recently entered clinical development. Information about primary resistance to these compounds in HIV-HCV-coinfected patients is scarce.

**Methods:** All individuals newly diagnosed with HIV-1 at several clinics in Madrid between 2000 and 2010 were tested for serum HCV antibody and HCV RNA. The NS3 protease and NS5B polymerase genes were sequenced in all HCV viraemic patients with genotype 1 (G1).

**Results:** From 1,684 individuals newly diagnosed with HIV-1 during the 10-year study period, 141 (8.4%) were positive for serum HCV RNA. Overall, 58% were infected with G1, being 1a in 64.2% of them. Altogether, 62% of G1a and 30% of G1b harboured HCV drug-resistant changes, with the most common being prQ80K ( $n=9$ ),

prV55A ( $n=2$ ), polC316Y/N ( $n=3$ ) and polV499A ( $n=24$ ). Although no primary resistance mutations were identified for HCV protease inhibitors or nucleoside analogues, mutations C316Y/N and V499A conferring resistance to some non-nucleoside analogues were found in 6% and 51% of G1 patients, respectively.

**Conclusions:** Natural DAA resistance-associated mutations are frequently seen in HIV-HCV-coinfected individuals. Changes polV499A and prQ80K seem to be natural polymorphisms and their effect on treatment outcomes warrants further examination. However, drug resistance testing in HCV drug-naïve individuals coinfecting with HIV currently does not seem to be warranted before using HCV protease inhibitors and nucleoside analogues. More information is needed for HCV non-nucleoside analogues.

## Introduction

Oral drugs designed to inhibit the HCV serine protease and the RNA-dependent RNA polymerase have recently entered the late phases of clinical development [1–4]. Overcoming toxicities and resistance are among the main challenges in HCV drug development. Primary resistance to these compounds in HCV-monoinfected patients seems to be low, in the range of 0.2–2.8%, with significant differences between HCV genotypes/subtypes and when considering distinct compounds [5–10].

There is scarce information on the rate of these changes in the HIV-infected population. Hypothetically, a larger HCV variability due to immunodeficiency [11,12] and a potential effect of HIV antiretroviral drugs on HCV enzymes [13] could increase the rate of primary HCV drug resistance-associated mutations in

HIV-HCV-coinfected patients. If significant rates of primary resistance mutations to these agents are recognized (for example, >5–10%), HCV drug resistance testing could be advisable before these compounds are prescribed, as it is currently recommended for anti-retroviral drugs [14].

## Methods

All individuals newly diagnosed with HIV-1 at several clinics in Madrid between January 2000 and February 2010 were tested for serum HCV antibodies using a commercial enzyme immunoassay. HCV seroreactive specimens were further tested for serum HCV RNA using either the Abbott real-time HCV quantitative assay (Abbott Laboratories, Madrid, Spain) or Versant

3.0 bDNA (Siemens, Barcelona, Spain). In viraemic patients, HCV genotype was analysed using LiPA version 2.0 (Innogenetics, Ghent, Belgium).

The NS3/NS4A protease and NS5B polymerase genes were sequenced in HCV genotype 1 (G1) patients. Viral RNA was extracted from plasma samples using a QUIamp viral RNA mini extraction kit (Qiagen, Hamburg, Germany) following the manufacturer's instructions. Both regions were amplified using a reverse transcriptase (RT) nested PCR using specific primers for subtype 1a and 1b. The primers used for the amplification of the NS3/NS4A protease subtype 1a were: PR1aEF1 (5'-CGA GAT CTG GCC GTG GCTG-3'), PR1aER1 (5'-GAC TGT CTG GGT GAC ACA CG-3'), PR1aEF2 (5'-TGA CAT AAT AAT TTG TGA CG-3') and PR1aER2 (5'-GTG ACG GCA GCT GTA AAA GC-3') as outer primers, and PR1aIF1 (5'-GTG CGG TGA CAT CAT CAA CG-3'), PR1aIR1 (5'-CGA GCT CGT CGC ACT TCT TC-3'), PR1aIF2 (5'-TTG ACC AAG CAG AGA CTG CG-3') and PR1aIR2 (5'-GTC TGC AGG AGG CCG AGG GC-3') as inner primers. The primers used for the amplification of the NS3/NS4A protease subtype 1b were: PR1bEF1 (5'-GGG CTC ATY CGT GCA TGC ATG-3'), PR1bER1 (5'-CGT CGT CTC AAT GGT GAA GG-3'), PR1bEF2 (5'-CCC TTC TAT GGC AAA GCC AT-3') and PR1bER2 (5'-TTC CAC ATG TGC TTC GCCC-3') as outer primers, and PR1bINF1 (5'-GAG ACC AAG RTC ATC ACC TGG-3'), PR1bINR1 (5'-CGA CTG TCT GGG TGA CAC ATG-3'), PR1bINF2 (5'-CTY GAT GTG TCC GTC ATA CC-3') and PR1bINR2 (5'-GCC TCC GCT TGC TTG GTG GC-3') as inner primers.

The primers used for the amplification of the NS5B polymerase subtype 1a were: POL1aEF1 (5'-CTT CCA TGC CCC CCC TGG AG-3'), POL1aER1 (5'-CGG AGT ACC TGG TCA TAGC-3'), POL1aEF2 (5'-GAG AGG CTT TAT GTT GGG GG-3') and POL1aER2 (5'-CAG CTA GCC GTG ACT AGG GC-3') as outer primers, and POL1aIF1 (5'-GGA TCC GGA TCT CAG CGA CG-3'), POL1aIR1 (5'-CTT TCA CAG ATA ACG ACTA-3'), POL1aIF2 (5'-GCT GTG GTA ACA CCC TCA CTTG-3') and POL1aIR2 (5'-ACA GGA AAT GGC CTA AGA GG-3') as inner primers. The primers used for the amplification of the NS5B polymerase subtype 1b were: POL1bEF1 (5'-CCG TGT CTT CTG CCT TGGC-3'), POL1bER1 (5'-GTA CCT AGT CAT AGC CTC CG-3'), POL1bEF2 (5'-CAT ATG ACA CCC GCT GTT TTG-3') and POL1bER2 (5'-CTA GGG CTA AGA TGG AGCC-3') as outer primers, and POL1bIF1 (5'-CCC CCC CTT GAG GGR GAGC-3'), POL1bIR1 (5'-CAC AGA TAA CGA CAA GGT CG-3'), POL1bIF2 (5'-GCC ATA AGG TCG CTC ACA GA-3') and POL1bIR2 (5'-CTA TTG GCC TGG AGT GTT TAGC-3') as inner primers. Conditions for the RT-PCRs were 50°C for 30 min, 94°C for 15 min, 40 cycles at 94°C for 35 s,

53–55°C for 30 s and 72°C for 1 min and 30 s, and a final extension at 72°C for 10 min. For the nested PCR the conditions were 94°C for 15 min, 40 cycles at 94°C for 35 s, 53–55°C for 35 s, and 72°C for 1 min and 30 s, and a final extension at 72°C for 10 min. PCR amplicons were purified using the High Pure PCR Product Purification kit (Roche, Mannheim, Germany) and directly sequenced using the ABI PRISM 3100 Genetic Analyser using the ABI PRISM Rhodamine Terminator reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) and inner primers for each genetic region. Sequences were aligned and analysed for mutations using the SeqScape V2.5 software (Applied Biosystems).

## Results

A total of 1,684 newly diagnosed HIV-1 individuals were identified during the 10-year study period. Serum HCV RNA was positive in 141 (8.4%). Median viral load was 5.6 log IU/ml in viraemic patients. Approximately 20% of HCV-seropositive specimens were aviraemic, reflecting spontaneous clearance. In the remaining viraemic HCV population, males were 74% and their median age was 40 years old. Transmission route had been intravenous drug use in 46%, homosexual relationships in 27%, heterosexual contacts in 22%, and was either other or unknown in the remaining 5%. The origin of the coinfecting population was as follows: 63% were native Spaniards, 13% Latin-Americans, 13% Sub-Saharan Africans, 9% originated in other European countries and the remaining 2% came from other regions. As expected in newly diagnosed individuals, all were antiretroviral-naïve. The median CD4<sup>+</sup> T-cell count in our coinfecting population was 387 cells/mm<sup>3</sup> (IQR 182–689) and the median plasma HIV RNA was 4.6 log copies/ml. Overall, 37% of patients had a CD4<sup>+</sup> T-cell count <200 cells/mm<sup>3</sup>.

The distribution of HCV genotypes was as follows: 67 G1 (58%), being 43 1a, 20 1b and 4 untypable, 24 G4 (21%), 22 G3 (19%) and 3 G2 (2%). Complete sequences from G1 patients could be obtained for 55 proteases and 47 polymerases. The remaining samples did not amplify most likely due to low HCV RNA levels and/or sequence diversity in primer binding regions. For 6 specimens, there was not enough volume for further virological characterization. Drug resistance mutations examined at the HCV protease and polymerase were those recorded at the last updated list from Sarrazin and Zeuzem [15], which considers 9 positions at the NS3/4A protease and 15 at the NS5B polymerase. Two changes were found at the protease: Q80K (8 G1a and 1 G1b) and V55A (2 G1a).

Table 1 records the results of this study in comparison with findings from others [5,6] and the GenBank database. Three changes were found at the polymerase:

**Table 1.** Naturally occurring HCV protease and polymerase inhibitor resistance associated mutations in genotype 1 patients

Resistance-associated mutation	GenBank database	Bartels <i>et al.</i> [5]	Kuntzen <i>et al.</i> [6]	Gaudieri <i>et al.</i> [7]	Current study (all HIV-HCV-coinfected)
<b>NS3 protease, number tested</b>	3,197–3,328	570	507 <sup>a</sup>	192 <sup>b</sup>	55
V36A/M/L/G, %	0.03	0.9	1.6 <sup>c</sup>	1	0
T54S/A, %	–	–	1.8	3 <sup>c</sup>	0
V55A, %	–	–	–	–	3.6
Q80R/K, %	–	–	–	–	16 <sup>c</sup>
R109K, %	0.21	0.2	0	1	0
R155K/T/I/M/G/L/S, %	0.03	0.7	0.6 <sup>c</sup>	0.5	0
A156S/T/V/I, %	–	–	0	0	0
D168A/V/E, %	–	–	0.2	1 <sup>c</sup>	0
V170A, %	0.12	0.2	0	5 <sup>c</sup>	0
<b>NS5B polymerase, number tested</b>	–	–	–	212 <sup>b</sup>	47
S282T/R, %	–	–	–	0.4	2
L314F, %	–	–	–	0	0
C316Y/N/F/S, %	–	–	–	2	11
M411S, %	–	–	–	0	0
M423T/I, %	–	–	–	1.4	0
V499A, %	–	–	–	75 <sup>c</sup>	51 <sup>c</sup>

<sup>a</sup>Overall 28% coinfecting with HIV. <sup>b</sup>Overall 42% coinfecting with HIV. <sup>c</sup>Significantly more frequent in HCV subtype 1a than 1b.

C316N (2 G1b), C316Y (1 G1a) and V499A (21 G1a and 3 G1b). Altogether 62% of HIV-HCV-coinfected patients with G1a and 30% with G1b harboured  $\geq 1$  HCV drug resistance-associated change. No primary drug resistance mutations were identified for HCV protease inhibitors or nucleoside analogues. By contrast, primary resistance changes for some HCV non-nucleoside analogues were found; mutation C316Y/N at the polymerase, which confers resistance to pockets 3 and 4 non-nucleoside analogues (for example, HCV-796, ANA-598 and ABT-333) was found in 6% of G1 patients. Mutation V499A, which may compromise the activity of thumb non-nucleoside analogues (for example, MK-3281 and BI-1941) was found in 51% of G1 patients, behaving as a natural polymorphism, particularly common in HCV subtype 1a.

## Discussion

This is one of the first studies providing information about the rate of primary drug resistance to direct acting antivirals (DAA) against HCV in HIV-coinfected individuals. From an initial population of 1,684 newly diagnosed HIV-1 individuals during the last 10 years in several HIV clinics in Madrid, Spain, serum HCV RNA was positive in 141 (8.4%) of them. Approximately 20% of HCV-seropositive specimens were aviraemic, reflecting spontaneous clearance, a rate which is in agreement with findings from other recent larger studies performed in HIV-infected individuals [16].

Sequencing of the HCV protease and polymerase coding regions from plasma of HCV G1 patients were

successful in 55 and 47 of cases, respectively. Overall, our results suggest that mutations associated with resistance to either HCV protease or polymerase inhibitors are relatively common in HIV-HCV-coinfected individuals naive for DAA. However, primary resistance changes at the protease, as at codon 155, which have been associated *in vivo* with diminished viral response to telaprevir or boceprevir [15] were not recognized. In contrast, polC316Y/N changes, which have been associated with primary resistance to non-nucleosides HCV-796, ANA-598 and ABT-333 *in vivo* [15] were found in 1 G1a and 2 G1b patients. Interestingly, changes prQ80K and polV499A seem to be natural polymorphisms given their high prevalence (16% and 51%, respectively) in the study population; in addition, their effect on treatment outcomes using anti-HCV oral drugs warrants further examination. It should be highlighted that a valine at position 499 in the polymerase was more common than alanine in HCV subtype 1a, acting as the consensus amino acid, in contrast with HCV subtype 1b. These findings are somewhat similar to those reported by Gaudieri *et al.* [7], who tested samples from Australia, Switzerland and the United Kingdom (42% belonging to HIV-HCV-coinfected individuals), and found polC316Y/F/s and polV499A in only 2% and 75% of G1 patients, respectively. HCV subtype 1a represented 77% of their G1 population. Clearly, our results suggesting a higher rate of primary resistance mutations to some HCV non-nucleoside analogues in HIV-coinfected individuals warrants further investigation. Our results point out that it is the relative proportion of HCV subtype 1a versus 1b instead

of HIV coinfection that mainly influences the rate of primary HCV drug resistance changes.

In summary, we did not find any evidence for an overall increased rate of primary drug resistance mutations in HIV–HCV-coinfected individuals, taking as reference the data reported in HCV-monoinfected individuals [5,6]. Therefore, baseline HCV drug resistance testing does not seem to be warranted before prescription of the new HCV protease inhibitors and nucleoside analogues in this population. However, more information is needed regarding the potential effect of natural polymorphisms on any of the five classes of HCV non-nucleoside analogues, as our data suggest an increased rate of some resistance changes in the coinfecting population compared to HCV-monoinfected individuals. It may be the case that rather than HIV coinfection itself, it is the relative proportion of HCV subtypes 1a versus 1b in a given population that largely determines the rate of primary HCV drug resistance. Further studies testing larger populations and including patients with prior exposure to antiretroviral therapy are warranted.

## Acknowledgements

AT, CDM and VS designed the study. AT, PP, AM, ZP and EP participated in the laboratory work. CR, JDR and VS provided and checked the clinical data for all patients. AT, CDM and VS wrote the manuscript. All authors reviewed the draft and approved the final version.

This work was supported in part by grants from Fundación Investigación y Educación en SIDA (IES), Red de Investigación en SIDA (RIS, RD06/0006), Agencia Lain Entralgo and the NEAT project (European Union 6th Framework Programme, reference LSHP-CT-2006-037570).

## Disclosure statement

The authors declare no competing interests.

## References

1. McHutchison JG, Everson GT, Gordon SC, et al. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N Engl J Med* 2009; **360**:1827–1838.
2. Hézode C, Forestier N, Dusheiko G, et al. Telaprevir and peginterferon with or without ribavirin for chronic HCV infection. *N Engl J Med* 2009; **360**:1839–1850.
3. Kwo P, Lawitz E, McCone J. Response guided therapy for boceprevir combination treatment? Results from HCV SPRINT-1. *60th Annual Meeting of the American Association for the Study of Liver Diseases*, October 30–November 3 2009, Boston, MA, USA. Abstract 1582.
4. Soriano V, Peters M, Zeuzem S. New therapies for hepatitis C virus infection. *Clin Infect Dis* 2009; **48**:313–320.
5. Bartels DJ, Zhou Y, Zhang EZ, et al. Natural prevalence of hepatitis C virus variants with decreased sensitivity to NS3/4A protease inhibitors in treatment-naïve subjects. *J Infect Dis* 2008; **198**:800–807.
6. Kuntzen T, Timm J, Berical A, et al. Naturally occurring dominant resistance mutations to hepatitis C virus protease and polymerase inhibitors in treatment-naïve patients. *Hepatology* 2008; **48**:1769–1778.
7. Gaudieri S, Rauch A, Pfafferott K, et al. Hepatitis C virus drug resistance and immune-driven adaptations: relevance to new antiviral therapy. *Hepatology* 2009; **49**:1069–1082.
8. Kim AY, Timm J, Nolan BE, et al. Temporal dynamics of a predominant protease inhibitor-resistance mutation in a treatment-naïve, hepatitis C virus-infected individual. *J Infect Dis* 2009; **199**:737–741.
9. Colson P, Brouk N, Lembo F, Castellani P, Tamalet C, Gerolami R. Natural presence of substitution R155K within hepatitis C virus NS3 protease from a treatment-naïve chronically infected patient. *Hepatology* 2008; **47**:766–767.
10. Le Pogam S, Seshadri A, Kosaka A, et al. Existence of hepatitis C virus NS5B variants naturally resistant to non-nucleoside, but not to nucleoside, polymerase inhibitors among untreated patients. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**:1205–1216.
11. Netski DM, Mao Q, Ray SC, Klein RS. Genetic divergence of hepatitis C virus: the role of HIV-related immunosuppression. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2008; **49**:136–141.
12. Soriano V, Perelson A, Zoulim F. Why different dynamics of selection of drug resistance in HIV, hepatitis B and C viruses? *J Antimicrob Chemother* 2008; **62**:1–4.
13. Morsica G, Bagaglio S, Uberti-Foppa C, Galli L, Lazzarin A. Detection of hepatitis C mutants with natural resistance to NS3/4A protease inhibitors in HIV/HCV-coinfected individuals treated with antiretroviral therapy. *J Acquir Immune Defic Syndr* 2009; **51**:106–108.
14. Hirsch MS, Gunthard HF, Schapiro JM, et al. Antiretroviral drug resistance testing in adult HIV-1 infection: 2008 recommendations of an international AIDS Society–USA panel. *Clin Infect Dis* 2008; **47**:266–285.
15. Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with HCV infection. *Gastroenterology* 2010; **138**:447–462.
16. Soriano V, Mocroft A, Rockstroh J, et al. Spontaneous viral clearance, viral load and genotype distribution of hepatitis C virus in HIV-infected patients with anti-HCV antibodies in Europe. *J Infect Dis* 2008; **198**:1337–1344.

Accepted 5 September 2010; published online XX XXXX 2011

## Impact of antiretroviral therapy on the variability of the HCV NS5B polymerase in HIV/HCV co-infected patients

Zulema Plaza<sup>1</sup>, Vincent Soriano<sup>1</sup>, Maria del Mar Gonzalez<sup>1</sup>, Federico A. Di Lello<sup>2</sup>, Juan Macias<sup>2</sup>, Pablo Labarga<sup>1</sup>, Juan Antonio Pineda<sup>2</sup> and Eva Poveda<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Department of Infectious Diseases, Hospital Carlos III, Madrid, Spain; <sup>2</sup>Department of Infectious Diseases and Microbiology, Hospital Universitario de Valme, Seville, Spain

\*Corresponding author. Tel: +34-91-4532650; Fax: +34-91-7336614; E-mail: evapoveda@hotmail.com

Received 21 July 2011; revised 21 July 2011; accepted 22 August 2011

**Objectives:** Assessment of the impact of antiretroviral drugs on the variability of hepatitis C virus (HCV) NS5B polymerase in HIV/HCV co-infected individuals.

**Methods:** HCV NS5B polymerase was sequenced from plasma at baseline and at the end of follow-up in HIV/HCV co-infected individuals on a stable antiretroviral regimen seen at two outpatient clinics for at least 2 years. The presence of mutations associated with drug resistance to experimental HCV polymerase inhibitors was examined.

**Results:** Sixty-one HIV/HCV co-infected patients (34% HCV-1a, 25% HCV-1b, 18% HCV-3 and 23% HCV-4) were analysed. The mean time on antiretroviral therapy was 52 months. All patients received HIV nucleoside analogues; 66% along with non-nucleoside analogues. The median HCV RNA was 6.1 log at baseline and 6 log IU/mL at the end of follow-up. The median HIV RNA was 4.4 log at baseline and 1.5 log copies/mL at the end of follow-up. No evidence of selection of NS5B polymerase inhibitor resistance mutations was seen when comparing samples collected at baseline and at the end of follow-up from the same individuals. All NS5B sequences from HCV-1a and HCV-3 showed V499A, associated with resistance to HCV non-nucleoside site-1 inhibitors (NNI-1). In addition, HCV-3 showed I482L, associated with resistance to NNI-2, and HCV-4 showed M414L, I482L and V499A, associated with resistance to NNI-3, 2 and 1, respectively. Two HCV-1b patients showed C316N, related with resistance to NNI-4.

**Conclusions:** The use of antiretroviral drugs does not increase the rate of primary drug resistance mutations to HCV NS5B polymerase inhibitors in HIV/HCV co-infected patients. However, natural polymorphisms associated with reduced susceptibility to some HCV NNIs are common, particularly in HCV variants other than HCV-1b.

**Keywords:** hepatitis C, HIV/HCV co-infection, drug resistance

### Introduction

The combination of peg interferon- $\alpha$  and ribavirin was, until recently, the only therapeutic option for hepatitis C virus (HCV) and was limited by poor efficacy and frequent side effects. These two limitations were further accentuated in HIV/HCV co-infected patients.<sup>1</sup> Thus, the advent of new direct acting antivirals (DAAs) against HCV is eagerly awaited for the treatment of chronic hepatitis C in HIV co-infected individuals. These drugs target distinct viral proteins, including the NS3 protease, the NS5B polymerase and the NS5A protein.<sup>2</sup>

The HCV protease inhibitors telaprevir and boceprevir are already being marketed, and many other compounds are in advance stages of clinical development. HCV nucleos(t)ide inhibitors (NIs) of the NS5B polymerase characteristically display a higher barrier

to resistance than other DAAs.<sup>3</sup> They compete with the physiological nucleoside analogues binding to the polymerase catalytic site, and mutations abrogating their binding strongly compromise the enzymatic function. Mutation S282T is characteristically selected *in vitro* by mericitabine, a cytidine analogue, and significantly impairs its inhibitory activity.<sup>4</sup> For nucleotides PSI-352938 and PSI-353661, both guanosine analogues, multiple amino acid changes at positions 15, 222, 223, 320 and 321 seem to be required for resistance.<sup>5,6</sup> HCV non-nucleoside inhibitors (NNIs) block the NS5B polymerase by allosteric mechanisms binding to pockets outside the active site. There are at least four such binding sites, sites 1–4. Mutations arising into or nearby these sites produce resistance to each of the NNI drug classes.<sup>2,7,8</sup>

Similar to the HIV reverse transcriptase, the HCV RNA-dependent enzyme (NS5B polymerase) exhibits poor fidelity and



lacks proofreading activity.<sup>8</sup> Consequently, a large number of heterogeneous viral variants are produced during multiple HCV replication cycles. In patients co-infected with HIV and HCV, the immunodeficiency caused by HIV might hypothetically enhance HCV variability. Moreover, the use of some antiretroviral agents, particularly HIV reverse transcriptase inhibitors, might unintentionally induce changes in the HCV polymerase, as it was shown unexpectedly in HIV using entecavir, an antiviral for treating hepatitis B.<sup>9</sup> If either of these two facts are proven, the rate of primary resistance mutations to DAA might be greater in HIV/HCV co-infected than in HCV mono-infected individuals. The aim of this study was to assess the impact of antiretroviral drugs on the variability of HCV NS5B polymerase in HIV/HCV co-infected individuals.

## Patients and methods

All HIV/HCV co-infected patients on regular follow-up between the years 2000 and 2010 at the HIV outpatient clinics of Hospital Universitario de Valme (Seville) and Hospital Carlos III (Madrid) were evaluated. For the purpose of this study, only individuals on a stable antiretroviral regimen for at least 2 years and who had never been exposed to peg interferon- $\alpha$ /ribavirin and/or any DAA for treating hepatitis C were chosen. Plasma samples stored at  $-80^{\circ}\text{C}$  were obtained from the laboratory refrigerators, and those from individuals who had specimens collected before beginning antiretroviral therapy and at last follow-up on the same regimen were selected. Only individuals with available specimens with an interval of at least 2 years were chosen. This study has been approved by the Ethics Committee of Hospital Carlos III, Madrid, Spain.

Plasma HIV RNA was measured using Versant 3.0 bDNA (Siemens, Barcelona, Spain). Plasma HCV RNA was quantified using the Abbott Real-Time HCV quantitative assay (Abbott Laboratories, Madrid, Spain). In HCV viraemic patients, HCV genotype was determined using LiPA v2.0, a commercial hybridization assay (Innogenetics, Ghent, Belgium).

The HCV NS5B polymerase was sequenced in paired specimens collected at baseline and at the end of follow-up. HCV RNA was extracted from plasma samples using a QIAamp viral RNA mini extraction kit (Qiagen, Hamburg, Germany) following the manufacturer's instructions. The NS5B polymerase gene was amplified using a reverse transcriptase nested PCR using specific primers for each HCV genotype/subtype. Primers for HCV-1a and HCV-1b were previously described elsewhere.<sup>10</sup> Primers for HCV-3 were POLEF3 (5'-ATT CAA CGT CGT CTA GAA GCG C-3') and POLER3 (5'-AAG ATG CCT ACC CCT AC-3') as outer primers, and POLIF3 (5'-GGA GGT RAA GGA GCG AGC G-3') and POLIR3 (5'-CCC GCY ATT TGC TGC TTT GC-3') as inner primers. Primers for HCV-4 were POLEF4 (5'-GGA TCR GAG GAY GTM GTR TG-3') and POLER4 (5'-TGT GAT AAA TGT CYC CCC CG-3') as outer primers, and POLIF4 (5'-CTG CCM ATY ARC CCC CTG AG-3') and POLIR4 (5'-GGC AAT GGA GTG AGT YTG-3') as inner primers.

Conditions for the RT-PCR procedures were previously described elsewhere.<sup>10</sup> PCR amplicons were directly sequenced in both senses using the ABI PRISM 3100 Genetic Analyser using the ABI PRISM Rhodamine Terminator reaction kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Finally, HCV sequences were aligned and analysed for drug resistance mutations using SeqScape v2.5 software (Applied Biosystems).

## Results

A total of 61 HIV/HCV co-infected individuals fit the inclusion criteria and had available stored plasma specimens. The main characteristics of this population are summarized in Table 1. Overall, 61% were male and their median age was 47 years old.

The average time on antiretroviral therapy was 52 months. All patients received nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NRTIs), 66% of them along with non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs). Median plasma HIV RNA at baseline was 4.4 log copies/mL [interquartile range (IQR) 3.6–5] and 1.5 log copies/mL (IQR 1.5–1.7) at the end of follow-up. The median serum HCV RNA at baseline was 6.1 log IU/mL (IQR 5.5–6.8) and 6 log IU/mL (IQR 5.7–6.2) at the end of follow-up. The distribution of HCV genotypes was as follows: 36 HCV-1 (59%; 21 HCV-1a and 15 HCV-1b), 11 HCV-3 (18%) and 14 HCV-4 (23%).

Drug resistance mutations examined in the HCV NS5B polymerase gene were those recorded in the last updated list by Sarrazin and Zeuzem,<sup>7</sup> along with six additional mutations (S15G, S96T, R222Q, C223Y/H, L320I and V321I), which have recently been reported for the NIs PSI-352938 and/or PSI 352661.<sup>5,6</sup>

At baseline and at the end of follow-up, the prevalence of changes associated with resistance to NS5B polymerase inhibitors differed according to HCV genotypes/subtypes. As shown in Table 2, all HCV-1a and HCV-3 patients showed V499A, which has been associated with resistance to HCV NNI-1 compounds. Likewise, all HCV-3 exhibited I482L, which has been associated with resistance to NNI-2 drugs. Finally, all HCV-4 patients showed changes M414L, I482L and V499A, which have been associated with resistance to NNI-3, NNI-2 and NNI-1 drugs, respectively. Only two HCV-1b patients (13.3%) showed C316N, a change that has been associated with resistance to NNI-4 drugs. The prevalence of these changes in our study population was similar to that reported in the GenBank database, which mainly derives from HCV mono-infected individuals (see Table 2).

In contrast with the large number of changes associated with resistance to NNIs, none of the NS5B polymerase sequences in

**Table 1.** Main characteristics of the study population (n=61)

Variables	Values
Male gender, n	37
Median age (years)	47
Mean time on antiretroviral drugs (months)	52
NRTIs, n	
tenofovir	12
abacavir	12
emtricitabine	12
lamivudine	23
zidovudine	13
didanosine	12
stavudine	5
Median baseline plasma HIV RNA (log copies/mL)	4.4
Median baseline plasma HCV RNA (log IU/mL)	6.1
HCV genotypes, n	
1a	21
1b	15
3	11
4	14



**Table 2.** Prevalence of drug resistance mutations in HCV NS5B polymerase in the study population

Family	Drug	HCV NS5B polymerase sites	HCV genotypes/subtypes			
			1a (n=21)	1b (n=15)	3 (n=11)	4 (n=14)
NI	PSI-353661; PSI-352938	S15G	0	0	0	0
		S96T	0	0	0	0
		C223Y/H	0	0	0	0
		L320I	0	0	0	0
		V321I	0	0	0	0
		R222Q	0	0	0	0
NNI-1	PSI-352938 mericitabine BI-207127; tegobuvir	S282T	0	0	0	0
		P495S/L/A/T	0	0	0	0
		P496A/S	0	0	0	0
NNI-2	VCH-759; VCH-916	V499A (GenBank)	A 100% (95.2%; n=153)	0	A 100% (100%; n=35)	A 100% (100%; n=10)
		L419M/V	0	0	0	NF
		M423T/I/V	0	0	0	NF
		Y448C/H	0	0	0	NF
		I482L/V/T (GenBank)	0	0	L 100% (100%; n=35)	L 100% (100%; n=10)
		V494I/A	0	0	0	0
NNI-3	filibuvir ANA-598	M423T/I/V	0	0	0	0
		M414T/L (GenBank)	0	0	0	L 100% (50%; n=10)
		G554D	0	0	0	0
		D559G	0	0	0	0
NNI-4	ABT-333; HCV-796 HCV-796	C316Y/N (GenBank)	0	N 13.3% (16.8%; n=155)	0	0
		S365T/A	0	0	0	0

NI, nucleos(t)ide inhibitors; NNI, non-nucleoside inhibitors; A, arginine; N, asparagine; L, leucine.

our study exhibited mutations associated with resistance to NIs. Moreover, it should be noted that there was no evidence of selection of changes at positions associated with resistance to NIs or NNIs when comparing baseline specimens and those collected after more than 2 years of exposure to antiretroviral therapy, including NRTIs.

## Discussion

This study explored the potential influence of HIV infection and antiretroviral drugs on the variability of HCV NS5B polymerase, focusing on the selection of mutations potentially associated with resistance to HCV polymerase inhibitors in clinical development. A total of 61 HIV/HCV co-infected individuals who had never been exposed to peg interferon- $\alpha$ /ribavirin and/or any experimental DAA were evaluated. All initiated antiretroviral therapy with regimens that included two NRTIs. Changes associated with resistance to HCV polymerase inhibitors, both NIs and NNIs, were examined at baseline and after at least 2 years of antiretroviral therapy. At baseline, no mutations associated with resistance to NIs were found. In contrast, changes associated with resistance to NNIs were demonstrated in all HCV genotypes/subtypes except HCV-1b, and therefore could be considered as natural polymorphisms. This was the case for mutation V499A, which produces resistance to NN-1 drugs (i.e. tegobuvir and BI-207127). Likewise, mutations I482L and V499A, which have been associated with resistance to NNI-2 drugs (i.e. VCH-759 and VCH-916) were found in all HCV-3 and HCV-4 patients. Finally, three mutations (M414L, I482L and V499A), which have been associated with resistance to NNI-3, NNI-2 and NNI-1 drugs, respectively, were found in all HCV-4 patients. Interestingly, no changes associated with resistance to NNIs were found in HCV-1b, but in 2/15 individuals who harboured C316N, a mutation that has been associated with resistance to NNI-3 (i.e. ANA-598) and NNI-4 drugs was found (i.e. HCV-796 and ABT-333). It should be noted that the rate and HCV genotype/subtype distribution of all these polymorphisms was comparable to that recorded in GenBank, where sequences primarily derive from HCV monoinfected individuals. Moreover, similar figures have been reported in other studies conducted in both HCV monoinfected<sup>11</sup> and newly diagnosed HIV/HCV co-infected individuals.<sup>10</sup>

It should also be noted that changes in the NS5B polymerase did not differ when comparing specimens collected before beginning antiretroviral therapy and after an average of 4 years of exposure to antiretroviral drugs, strongly suggesting that NRTIs and NNRTIs do not result in mutations that might compromise the activity of DAAs. Indeed, this observation is consistent with the fact that structural differences between HIV reverse transcriptase and HCV polymerase are of such magnitude<sup>9</sup> that compounds targeting their respective catalytic sites or binding allosteric pockets should not exhibit any cross-activity.

The therapeutic implications of our findings are immediate. Natural polymorphisms in the NS5B polymerase at positions that influence the susceptibility to DAAs should preclude using some NNIs in HCV genotypes/subtypes in which they are universally found. It should be noted, however, that the extent of resistance varied for distinct changes. While mutation V499A results in only a minor reduction in the activity of NNI-1 drugs, changes I482L,

M414L and C316N confer intermediate or high-level resistance to NNI-2, NNI-3 and NNI-4 drugs, respectively.<sup>11,12</sup> Taking into account this information, baseline resistance testing in HCV does not seem to be justified at this time. All individuals should be susceptible to NIs; likewise almost all infected with HCV-1b should also be susceptible to NNIs. In contrast, patients infected with HCV-1a, HCV-3 or HCV-4 will display a naturally reduced susceptibility to distinct NNIs. A further implication of our findings refers to the convenient use of accurate HCV genotyping/subtyping tools. Differences in DAA susceptibility between HCV-1a and HCV-1b have only recently been appreciated, and based on our findings, clearly apply to NNIs. In this regard, it must be noted that the last version of LiPa seems to perform quite well in discriminating these HCV variants.<sup>13</sup>

Several limitations of our study must be acknowledged. First, although our study population was exposed to the majority of antiretroviral agents, not all NRTIs were similarly prescribed. Thus, we cannot definitively state that some NRTIs, such as stavudine, which was poorly represented in our population, might induce changes in HCV NS5B polymerase. However, a fairly good representation of all other NRTIs was seen in our study population, and thus we are confident that any impact on HCV variability was reasonably excluded. Another limitation of our study was the use of bulk sequencing to explore drug resistance mutations. In this regard, the presence of viral genomes with a small number of resistant changes might have been missed. To exclude the presence of minority variants, more sensitive tools such as allele-specific PCR or ultra-deep sequencing are needed. However, at this time it is unclear whether the presence of drug-resistant mutant viruses at low levels has any clinical or therapeutic relevance.

In summary, the use of antiretroviral drugs in HIV-infected individuals does not increase the rate of resistance to HCV polymerase inhibitors in co-infected patients. However, the presence of natural polymorphisms associated with reduced susceptibility to some HCV NNIs is common in HCV-1a, HCV-3 and HCV-4, regardless of HIV co-infection, and should be considered before prescribing these drugs.

## Acknowledgements

This work was presented at the Ninth European Workshop on HIV & Hepatitis—Treatment Strategies & Antiviral Drug Resistance, Paphos, Cyprus, 2011 (Poster number 36), and at the Forty-sixth Annual Meeting of the European Association for the Study of the Liver, Berlin, Germany, 2011 (Abstract number 1230).

## Funding

This work was supported in part by grants from Fundación Investigación y Educación en SIDA (FIES), the NEAT (European AIDS Treatment Network; LSHM-CT-2006-037570) project, the European Community's Seventh Framework Program (FP7/2007-2013) under the project 'Collaborative HIV and Anti-HIV Drug Resistance Network (CHAIN)'—no. 223131, Red de Investigación en SIDA (ISCIII-RETIC-RD06/006) and Fondo de Investigación Sanitaria (CP08/00214 and PI10/02166). J. A. P. is the recipient of an intensification grant from the Fundación Progreso y Salud of the Consejería de Salud de la Junta de Andalucía (reference AI-0021).

## Transparency declarations

None to declare.

## Author contributions

V. S. and E. P. designed the study. Z. P. and M. d. M. G. did the laboratory work. Z. P. and E. P. did the data analysis. Z. P., V. S. and E. P. wrote the manuscript. F. A. D. L., J. M., P. L. and J. A. P. provided samples and clinical data and performed critical reading of the manuscript.

## References

- 1 Soriano V, Puoti M, Sulkowski M et al. Care of patients coinfecting with HIV and HCV: 2007 updated recommendations from the HCV-HIV international panel. *AIDS* 2007; **21**: 1073–89.
- 2 Soriano V, Vispo E, Poveda E et al. Directly acting antivirals against hepatitis C virus. *J Antimicrob Chemother* 2011; **66**: 1673–86.
- 3 McCown M, Rajyaguru S, Le Pogam S et al. The hepatitis C virus replicon presents a higher barrier to resistance to nucleoside analogs than to non-nucleoside polymerase or protease inhibitors. *Antimicrob Agents Chemother* 2008; **52**: 1604–12.
- 4 Le Pogam S, Sessaadri A, Kosaka A et al. Existence of hepatitis C virus NS5B variants naturally resistant to non-nucleoside, but not to nucleoside, polymerase inhibitors among untreated patients. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**: 1205–16.
- 5 Lam A, Espiritu C, Murakami E et al. Inhibition of hepatitis C virus replicon RNA synthesis by PSI-352938, a cyclic phosphate prodrug of  $\beta$ -D-2'-deoxy-2'- $\alpha$ -fluoro-2'- $\beta$ -C-methylguanosine. *Antimicrob Agents Chemother* 2011; **55**: 2566–75.
- 6 Lam A, Espiritu C, Bansal S et al. HCV replicon resistance for PSI-352938 and PSI-353661, prodrugs of 2'- $\alpha$ -F-2'- $\beta$ -C-methylguanosine, is mediated through multiple amino acid changes. *Antivir Ther* 2011; **16** Suppl 1: A23.
- 7 Sarrazin C, Zeuzem S. Resistance to direct antiviral agents in patients with hepatitis C virus infection. *Gastroenterology* 2010; **138**: 447–62.
- 8 Margeridon-Thermet S, Shafer R. Comparison of the mechanisms of drug resistance among HIV, hepatitis B, and hepatitis C. *Viruses* 2010; **2**: 2696–739.
- 9 McMahon M, Jilek B, Brennan T et al. The HBV drug entecavir—effects on HIV-1 replication and resistance. *N Engl J Med* 2007; **356**: 2614–21.
- 10 Treviño A, de Mendoza C, Parra P et al. Natural polymorphisms associated with resistance to new antivirals against HCV in newly diagnosed HIV-HCV-coinfecting patients. *Antivir Ther* 2011; **16**: 413–6.
- 11 Legrand-Abravanel F, Henquell C, Le Guillou-Guillemette H et al. Naturally occurring substitutions conferring resistance to hepatitis C virus polymerase inhibitors in treatment-naïve patients infected with genotypes 1–5. *Antivir Ther* 2009; **14**: 723–30.
- 12 Kukolj G, McGibbon G, McKercher G et al. Binding site characterization and resistance to a class of non-nucleoside inhibitors of the hepatitis C virus NS5B polymerase. *J Biol Chem* 2005; **280**: 39260–7.
- 13 Chevaliez S, Bouvier-Alias M, Brillet R et al. HCV genotype 1 subtype identification in new HCV drug development and future clinical practice. *PLoS One* 2009; **4**: e8209.